

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of Jean DEREGNAUCOURT et al.

U.S. Application Serial No. :

Filed :

**For : USE OF THE ENANTIOMER (1S, 2R) OF MILNACIPRAN FOR THE
PREPARATION OF A MEDICAMENT**

**I, Anne BOGARD, c/o CABINET REGIMBEAU, of
20 rue de Chazelles, F-75847 PARIS CEDEX 17, FRANCE, do
solemnly and sincerely declare that I am conversant with the English
and French languages and that to the best of my knowledge and belief
the following is a true and correct translation of the PCT Application
filed under No. PCT/FR2004/000347.**

Dated this 3rd day of August 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Anne Bogard", written over a horizontal line.

Anne BOGARD

**USE OF THE ENANTIOMER (1S, 2R) OF MILNACIPRAN FOR THE PREPARATION
OF A MEDICAMENT**

The present invention concerns the use of a mixture of enantiomers enriched in
5 the spatially configured (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its
metabolites, as well as their pharmaceutically-acceptable salts, for the preparation of a
drug intended to prevent or to treat disorders that can be managed by double inhibition
of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake, while limiting the risks of
cardiovascular disturbances and/or of organ and/or tissue toxicity. More specifically, the
10 mixture of enantiomers in accordance with the invention is intended to treat depression,
chronic fatigue syndrome and urinary incontinence.

Milnacipran (Z (±)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarbox-
amide), a molecule synthesized at the PIERRE FABRE MEDICAMENT Research Centre
15 (Castres, France), also called TN-912, dalcipran, minalcipran, midalcipran or midalipran
is known to be a dual inhibitor of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake.
Milnacipran and its method of preparation are described in US patent No. 4,478,836.
Other information relating to milnacipran can be found in the twelfth edition of the
Merck Index, as entry No. 6 281.

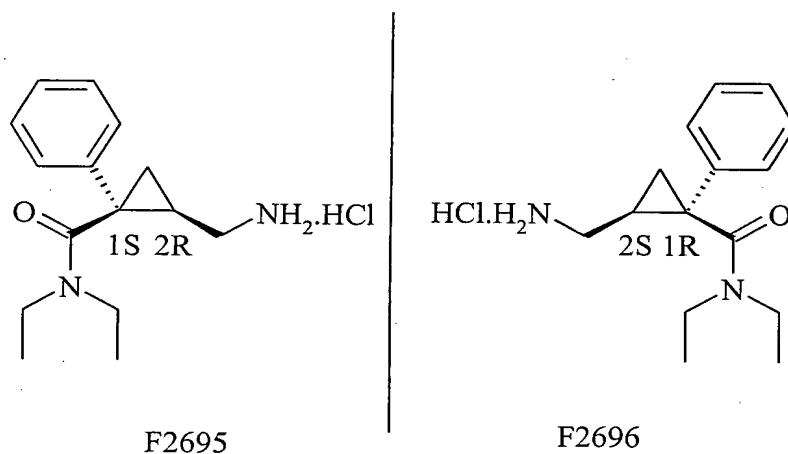
20 Dual inhibitors of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake correspond
to a well-known class of antidepressant agents which selectively inhibit reuptake of both
serotonin and noradrenaline. By way of example, venlafaxine and duloxetine are also
dual inhibitors of serotonin and noradrenaline. Studies have shown that the ratio of
noradrenaline reuptake inhibition to serotonin reuptake inhibition by milnacipran is
25 approximately 2:1 (Moret *et al.*, 1985 *Neuropharmacology* 24(12) : 1211-1219; Palmier
et al., 1989, *Eur J Clin Pharmacol* 37 : 235-238).

US patent 4,478,836 describes the use of milnacipran for the treatment of
disorders of the central nervous system, in particular depression. Patent application
WO01/26623 describes the use of milnacipran in association with phenylalanine and
30 tyrosine in indications such as the treatment of fatigue, syndromes associated with pain,
chronic fatigue syndrome, fibromyalgia and irritable bowel syndrome. Patent application

WO01/62236 describes a composition containing milnacipran in association with one or several antimuscarinic agents in a large number of indications including depression. Application WO97/35574 describes a pharmaceutical composition containing milnacipran and idazoxan as an associated product for use simultaneously, separately or staggered in time to treat depression and its various forms, as well as disorders in which antidepressants are used. Milnacipran is also indicated for use in the treatment of urinary incontinence (FR 2 759 290).

The milnacipran molecule possesses two asymmetric carbons giving two different spatial configurations (1S,2R) and (1R,2S). These spatial configurations being non-superposable, the milnacipran molecule therefore exhibits optical isomerism.

Milnacipran hydrochloride thus exists in the form of two optically active enantiomers: the dextrorotatory enantiomer or Z-(1S,2R)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide hydrochloride and the levorotatory enantiomer Z-(1R, 2S)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide hydrochloride. In its hydrochloride form, milnacipran (also called F2207) is currently marketed (IXEL, PIERRE FABRE MEDICAMENT, France) in the form of a racemic mixture as a serotonergic and noradrenergic antidepressant agent. F2695 et F2696 designate the dextrorotatory (1S,2R) and levorotatory (1R,2S) enantiomers respectively of milnacipran hydrochloride (F2207):



These two enantiomers can be separated and isolated using procedures described in the literature (Bonnaud *et al.*, 1985, *Journal of Chromatography*, Vol. 318 : 398-403;

Shuto *et al.*, *Tetrahedron letters*, 1996 Vol. 37 :641-644; Grard *et al.*, 2000, *Electrophoresis* 2000 21 : 3028-3034; Doyle and Hu, 2001, *Advanced Synthesis and Catalysis*, Vol. 343 : 299-302).

5 The inventors have now performed a pharmacokinetic study in man on the racemate and on the two enantiomers of milnacipran which uses enantiomer-selective assay methods. They have thus demonstrated the absence of racemization of the enantiomers *in vivo*.

Furthermore, although the racemate has been resolved, no analysis of the pharmacological and toxicological properties of the two enantiomers has been
10 performed using modern, currently available methods such as cardiovascular measurements by telemetry, or genomic analyses for predictive pharmacotoxicology *in vitro*.

As with any active substance, antidepressants can induce adverse events or certain toxic effects that essentially derive from the pharmacological properties of these
15 drugs, as well as from the dosage, from individual variations in patients (genetic polymorphism, organ-function insufficiency, gender, age) or from drug interactions. Antidepressants are thus the third most common class of products responsible for intoxication, after hypnotics and tranquillizers (Nores *et al.*, 1987 *Thérapie* 42 : 555-558). The risk of overdose with antidepressants is serious, since it can lead to death.
20 Among the causes of acute intoxication with antidepressants should be mentioned accidental ingestion by children (all the more so since certain antidepressants are used in the treatment of enuresis), suicide attempts, accidental overdosage by physicians, concomitant medications in elderly patients, age-related physiological and pharmacokinetic changes (cardiac insufficiency, hepatic and/or renal insufficiency ...)
25 and slowing down of metabolism whether genetic in origin or drug-induced (enzyme inhibition). After children, the elderly therefore represent the second at-risk population among patients treated. Elderly persons have higher plasma concentrations, related to reduced renal and/or hepatic clearance, and the risks of intoxication are more serious (Meadoer-Woodruff *et al.*, 1988 *J. Clin. Psychopharmacol.* 8 : 28-32).

30 The adverse side-effects, generally benign, which have been observed during treatment with milnacipran usually occur within the first week or the first two weeks of

treatment and diminish thereafter, in parallel with improvement in the depressive episode. The most commonly-reported adverse events in single-drug therapy or in association with other psychotropics are dizziness, hypersudation, anxiety, hot flushes and dysuria. Certain less commonly reported adverse events are nausea, vomiting, dry
5 mouth, constipation, tremor, palpitations, agitation, and cutaneous eruptions. Moreover, it is known that in patients with a history of cardiovascular disease or who concomitantly receive treatment for a cardiac condition, milnacipran can increase the incidence of cardiovascular adverse events (hypertension, hypotension, orthostatic hypotension, palpitations). In patents with high blood pressure or having heart disease it
10 is therefore recommended to increase medical supervision since milnacipran in the form of a racemic mixture is likely to increase the heart rate. In those rare cases of overdose observed with milnacipran (at doses from 800 mg to 1 g) in single-drug therapy, the main symptoms observed are vomiting, respiratory disturbances and tachycardia (The Vidal Dictionary 78th edition, 2002). Another adverse event occasionally induced by
15 milnacipran is elevated transaminase levels which may reflect a certain hepatic toxicity.

The at-risk populations that could potentially develop a certain number of adverse clinical manifestations during or following treatment with milnacipran are children, the elderly, patients with hepatic and/or renal insufficiency, patients receiving treatment that induces organ and/or tissue toxicity, in particular hepatic and/or renal
20 toxicity, patients receiving treatment for a heart condition or that induces cardiovascular side-effects, patients with a history of cardiovascular disease and/or having cardiovascular disorders, especially those with disorders of cardiac rhythm, of blood pressure (hypo- or hypertensive patients) and patients suffering from heart disease.

Concerned to prevent, to an ever greater extent, the occurrence of possible side-
25 effects that could constitute a danger, however small, to the health of patients treated with milnacipran, the inventors have now discovered that, surprisingly and unexpectedly, the (1S,2R) enantiomer of milnacipran, which is essentially responsible for the selective inhibitory activity on serotonin and noradrenaline reuptake, induced fewer side-effects of a cardiovascular nature and less organ and/or tissue toxicity,
30 especially hepatic, than the racemic mixture. In particular, the inventors have discovered that, in dogs, administration of the (1S,2R) enantiomer of milnacipran leads to a lesser

increase in heart rate and blood pressure, particularly diastolic blood pressure, than that which can be induced by administration of the racemic mixture. Moreover, the inventors have discovered that the (1S,2R) enantiomer of milnacipran hydrochloride (F2695) has a better profile of genomic toxicity than the (1R,2S) enantiomer of milnacipran hydrochloride (F2696) in an experimental model using primary rat hepatocytes. The
5 inventors have also demonstrated that the (1R,2S) enantiomer (F2696) has a profile of genomic toxicity similar to that obtained with clomipramine, which is used as a reference psychotropic product known for its relative hepatic toxicity.

The object of the present invention is thus the use of a mixture of enantiomers of
10 milnacipran enriched in the (1S,2R) enantiomer, preferentially the substantially pure F2695 enantiomer, as well as with their pharmaceutically-acceptable salts, for the preparation of a drug intended to prevent or to treat disorders or conditions that can be managed by double inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) uptake, while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting the risks of
15 organ and/or tissue toxicity.

The term "cardiovascular disturbances" is understood to refer to adverse cardiovascular side-effects of the drug administered alone or in association with other active substances.

For the purposes of the present invention, the phrase "side-effect" is understood
20 to mean the foreseeable activity of a drug in an area other than that for which it is administered, that may be bothersome or undesirable when it limits the use of the drug.

The term "toxicity" is understood to mean the property of a drug to induce harmful effects on organs or tissue, in particular organs or tissues involved in the metabolism of milnacipran, especially hepatic and/or renal metabolism of milnacipran,
25 and more specifically during the first pass of milnacipran in the liver. Preferentially, organ toxicity is cardiac toxicity and said tissue toxicity is hepatic and/or renal toxicity.

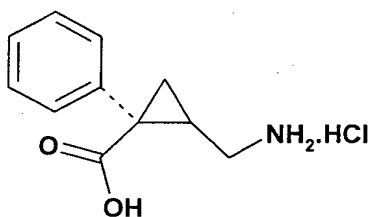
For the purposes of the present invention, the phrase "while limiting the risks of cardiovascular disturbances" or "while limiting the risks of toxicity" is understood to mean the fact of preventing these risks from increasing significantly in a patient
30 following administration of the drug.

For the purposes of the present invention, the term "(1S,2R) enantiomer of milnacipran" designates the (1S,2R) enantiomer of milnacipran, as well as its pharmaceutically-acceptable salts. Preferentially, this is the (1S,2R) enantiomer of milnacipran hydrochloride (F2695). "(1R,2S) enantiomer of milnacipran" designates the (1R,2S) enantiomer of milnacipran, as well as its pharmaceutically-acceptable salts such as the hydrochloride (F2696). "Racemic mixture" designates a 50:50 mixture by weight of the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and the (1R,2S) enantiomer of milnacipran, as well as their pharmaceutically-acceptable salts.

For the purposes of the present invention, "mixtures of the enantiomers of milnacipran enriched in the (1S,2R) enantiomer" signifies a mixture of the (1S,2R) enantiomer and the (1R,2S) enantiomer of milnacipran in which the mass/mass ratio of the (1S,2R) enantiomer to the (1R,2S) enantiomer is greater than 1:1. In the mixture of the enantiomers of milnacipran enriched in the (1S,2R) enantiomer, the mass/mass ratio of the (1S,2R) enantiomère to the (1R,2S) enantiomer is advantageously greater than or equal to 55:45, more advantageously greater than 60:40, yet more advantageously greater than 65:35, yet more advantageously greater than 70:30, yet more advantageously greater than 75:25, yet more advantageously greater than 80:20. Produced in a particularly advantageous mode, the mass/mass ratio of the (1S,2R) enantiomer to the (1R,2S) enantiomer is greater than 82:18, in a more advantageous manner greater than 84:16, in an even more advantageous manner greater than 86:14, in an even more advantageous manner greater than 88:12, in an even more advantageous manner greater than 90:10. Produced in a preferred mode, the mass/mass ratio of the (1S,2R) enantiomer to the (1R,2S) enantiomer is greater than 91:9, in a more preferred manner greater than 92:8, in an even more preferred manner greater than 93:7, in an even more preferred manner greater than 94:6, in an even more preferred manner greater than 95:5, in an even more preferred manner greater than 96:4, in an even more preferred manner greater than 97:3, in an even more preferred manner greater than 98:2, in an even more preferred manner greater than 99:1, in an even more preferred manner greater than 99.5:0.5. In a particularly preferred manner, the mixture of enantiomers of milnacipran enriched in the (1S,2R) enantiomer is substantially pure, that is to say, containing approximately 100% (1S,2R) enantiomers by weight.

The use of metabolites also enters into the scope of the present invention, preferentially the metabolites of milnacipran that are active *in vivo*, and their pharmaceutically-acceptable salts, such as:

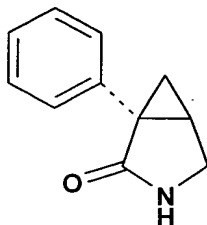
- the hydrochloride of Z-(±)phenyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane-carboxylic acid (F1567):



F1567

10	Molecular mass:	277.7
	Characteristics:	white crystals
	Melting point:	230°C
	Plate chromatography:	medium: silica
		Solvent: Butanol/ethanol/water (6/2/2)
15		Developer: Ultraviolet and ninhydrine
		Rf: 0.6

- (±)phenyl-3 methylene-3-4 pyrrolidone-3 (F1612):



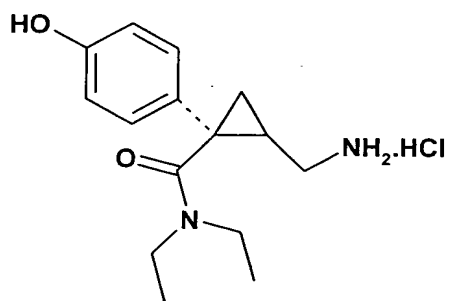
F1612

	Molecular mass:	173.2
	Characteristics:	white crystals

Melting point: 70°C
 Plate chromatography: medium: silica
 Solvent: Benzene/dioxane/ethanol (90/25/4)
 Developer: Ultraviolet and iodine
 Rf: 0.46

5

- the hydrochloride of Z(±)-(para-hydroxyphenyl)-1-diethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2782):



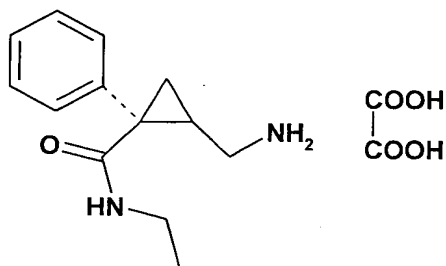
F2782

10

Molecular mass: 298.82
 Characteristics: white crystals
 Melting point: 250°C
 Plate chromatography: medium: silica
 Solvent: Butanol/ethanol/water (6/2/2)
 Developer: Ultraviolet and iodine - ninhydrine
 Rf: 0.42

20

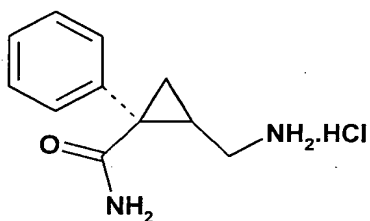
- the oxalate acid of Z(±)-phenyl-1-ethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2800):



F2800

	Molecular mass:	308.33
5	Characteristics:	white crystals
	Melting point:	150°C
	Plate chromatography:	medium: silica
		Solvent: CHCl ₃ /methanol/NH ₄ OH (90/9/1)
		Developer: Ultraviolet and ninhydrine
10		Rf: 0.40

- the hydrochloride of Z(±)-phenyl-1-aminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2941)



F2941

15	Molecular mass:	226.74
	Characteristics:	white crystals
	Melting point:	245°C
20	Plate chromatography:	medium: silica
		Solvent: CHCl ₃ /methanol/NH ₄ OH (80/18/2)
		Developer: Ultraviolet and ninhydrine
		Rf: 0.30

These metabolites have, just as milnacipran has, two asymmetric carbons giving two different spatial configurations (1S,2R) and (1R,2S). These spatial configurations being non-superposable, these metabolites also exhibit optical isomerism. The ratio of the two enantiomers of the metabolite of milnacipran in the mixture of enantiomers is as described above for enantiomers of milnacipran.

The present invention covers therefore these active metabolites, their enantiomers, as well as their pharmaceutically-acceptable salts, in addition to their use as a drug in the treatment of the disorders described in the present patent such as depression, pain, fibromyalgia and urinary incontinence. The metabolites in accordance with the invention are in the form of racemates or preferentially in the form of a mixture of enantiomers enriched in the most active (1S,2R) enantiomer. In a preferable manner, the active metabolite used comes from the F2695 enantiomer and is the (1S,2R) enantiomer of the active metabolite. In a more preferable manner, this is the (1S,2R) enantiomer of the hydrochloride of Z-(para-hydroxyphenyl)-1-diethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2782). The term "active metabolite" is understood to designate a derivative resulting from the metabolism of milnacipran *in vitro* or *in vivo* and having the capacity to inhibit reuptake of serotonin and of noradrenaline; preferentially, these are F2782, F2941, F2800, F1612 and F1567.

The object of the present invention is therefore the use of a mixture of enantiomers preferentially enriched in the (1S,2R) enantiomer of at least one metabolite of milnacipran, preferentially chosen among F2782, F2941, F2800, F1612 and F1567, as well as their pharmaceutically-acceptable salts, for the preparation of a drug intended to prevent or to treat disorders or conditions that can be managed by double inhibition of reuptake of serotonin (5-HT) and of noradrenaline (NA), while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in particular, cardiac, hepatic and/or renal toxicity.

The use of a mixture of enantiomers milnacipran enriched in the (1S,2R) enantiomer, preferentially the substantially pure F2695 enantiomer, and at least one of its metabolites, preferably chosen among F2782, F2941, F2800, F1612 and F1567, preferentially enriched in the (1S,2R) enantiomer, for the preparation of a drug intended

to prevent or to treat disorders or conditions that can be managed by double inhibition of reuptake of serotonin (5-HT) and of noradrenaline (NA), while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in particular, cardiac, hepatic and renal toxicity also enters into the scope of the present invention.

“Pharmaceutically-acceptable salt” designates all salts that retain the efficacy and properties of an active substance and that do not cause side effects. Preferentially, these are pharmaceutically-acceptable salts of mineral or organic acids. By way of example, but not limited to these, halohydrates such as the hydrochloride and the bromohydrate, the fumarate, the maleate, the oxalate, the citrate, the methanesulfonate, the glutamate, the tartrate, the mesylate and their possible hydrates should be mentioned.

For the purposes of the present invention, the term “mixture of enantiomers” signifies the mixture of enantiomers of milnacipran enriched in the (1S,2R) enantiomer, as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and/or the mixture of enantiomers of at least one of the metabolites of milnacipran, preferentially enriched in the (1S,2R) enantiomer, as well as their pharmaceutically acceptable salts.

The mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially substantially-pure F2695 enantiomer, is administered to all types of patients requiring such treatment, whether it be for therapeutic and/or prophylactic purposes. For therapeutic purposes, the aim is to eradicate or to improve the condition to be treated and/or one or more related symptoms. For prophylactic purposes, the aim is to prevent the appearance of the condition to be treated and/or of one or more related symptoms. Nevertheless, the mixture of enantiomers in accordance with the invention is particularly adapted to populations of at-risk patients who may be likely to develop certain adverse clinical manifestations during or following treatment with milnacipran in the racemic form. These are principally children, the elderly, patients with hepatic and/or renal insufficiency, patients receiving treatment that induces hepatic and/or renal organ and/or tissue toxicity, patients receiving treatment for a heart condition, patients receiving treatment that induces cardiovascular side-effects, patients with a history of cardiovascular disease (for example, myocardial infarctus) and/or having cardiovascular disorders, such as patients with cardiac rhythm disorders (tachycardia, bradycardia,

palpitations), patients with blood pressure disorders (hypo- or hypertensive patients) or patients suffering from heart disease.

Among the numerous disorders or conditions that have as symptoms cardiac rhythm disorders and for which the present invention is particularly well-adapted in the treatment of at-risk patients who suffer from them, tachycardia which corresponds to an acceleration of the rhythm of the heart beat (tachycardia is moderate when the heart rate is from 80 to 100 beats per minute, severe when it exceeds 100), palpitations, extrasystoles (sporadic, frequent or during myocardial infarctus), auricular fibrillation, flutter and auricular tachysystole, bradycardia, cardiac insufficiency, and myocardial infarctus should be mentioned.

Among the numerous disorders or conditions that have as symptoms blood pressure disorders and for which the present invention is particularly well-adapted in the treatment of at-risk patients who suffer from them, arterial hypertension, malignant arterial hypertension, pulmonary arterial hypertension, portal hypertension, paroxysmal essential hypertension, hypotension, orthostatic hypotension and intra-cranial hypertension should be mentioned.

Advantageously, those cardiovascular disorders for which the risks can be limited by the administration of the mixture of enantiomers in accordance with the invention, and preferentially by the administration of the substantially-pure F2695 enantiomer, are as follows :

- elevated diastolic and/or systolic blood pressure measured in millimeters of mercury (mmHg); more specifically, this is an increase in diastolic blood pressure, and/or,
- cardiac rhythm disorders, in particular, an increase in the patient's heart rate.

Systolic blood pressure is the maximal value for blood pressure, and it corresponds to the moment when the first heart sound is heard in the humeral artery during measurement of blood pressure. The systole is the interval of the cardiac cycle during which the heart cavities contract, causing expulsion of the blood. Diastolic blood pressure is the minimal value of blood pressure, corresponding to the disappearance of heart sounds in the humeral artery when the cuff of the sphygmomanometer is deflated

during measurement of blood pressure. The diastole is the interval of the cardiac cycle during which the heart cavities fill with blood. Elevation of systolic and/or diastolic pressure means increased blood pressure which is characteristic of systemic arterial hypertension (and its variant forms), the symptoms of which may be the following:

5 headache, fatigue, mild sensorial disturbances such as dizziness, buzzing in the ears, palpitations, nosebleed, confusion or drowsiness, cramps, numbness or tingling in the feet and hands. Systemic arterial hypertension (and its variant forms) can lead to serious, indeed fatal, complications: cerebral vascular accidents, left ventricular heart failure, kidney failure, ischemic heart diseases (myocardial infarctus, angor and their variant

10 forms). According to current guidelines, a patient is considered to have arterial hypertension when his/her diastolic blood pressure is above 90 mmHg and his/her systolic blood pressure is above 140 mmHg.

The toxicity for which the risks can be limited by the administration of the mixture of enantiomers in accordance with the invention is advantageously organ

15 toxicity, particularly cardiac toxicity, and/or tissue toxicity, in particular hepatic and/or renal toxicity. Tissue toxicity may be revealed by the presence of icterus or by laboratory markers.

The use of the mixture of enantiomers in accordance with the invention in veterinary medicine for the treatment of animals, in particular household pets or

20 breeding animals that require such treatment also enters into the scope of the present invention.

Because of their pharmacological properties, in particular as dual inhibitors of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake, the mixture of enantiomers is especially useful in the preparation of drugs intended for preventive and/or curative

25 treatment of a number of disorders and conditions (syndromes) described hereinafter, while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in particular cardiac, hepatic and/or renal toxicity.

Among these disorders or conditions, disorders of the central nervous system as defined in "*The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders –IV (DSM-IV)*,

30 *1995 American Psychiatric Association*" should be mentioned. By way of example, but not limited to these, the following disorders and conditions should be mentioned:

depression, in particular deep depression, resistant depression, depression in the elderly, psychotic depression, depression induced by treatment with interferon, depressive state, manic-depressive syndrome, seasonal depressive episodes, depressive episodes related to general health status, depressive episodes related to mood-altering substances, bipolar disease, schizophrenia, generalized anxiety, morose and marasmic states, stress-related diseases, panic attacks, phobias, in particular agoraphobia, obsessive-compulsive disorders, behavioral disorders, oppositional disorders, post-traumatic stress disorder, depression of the immune system, fatigue and accompanying pain syndromes, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and other functional somatic disorders, autism, disorders characterized by attention deficit due to general health status, attention disorders due to hyperactivity, eating disorders, neurotic bulimia, neurotic anorexia, obesity, psychotic disorders, apathy, migraine, pain and in particular chronic pain, irritable bowel syndrome, cardiovascular diseases and in particular anxiety-depressive syndrome in myocardial infarctus or in hypertension, neurodegenerative diseases and related anxiety-depressive syndromes (Alzheimer's disease, Huntington's chorea, Parkinson's disease), urinary incontinence, in particular urinary incontinence related to stress and enuresis, drug addiction and in particular anxiety addiction to tobacco, in particular to nicotine, to alcohol, to narcotics, to drugs, to analgesics used in weaning-off from these addictive states.

More specifically, the object of the present invention concerns the use of a mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, for the preparation of a drug intended to treat or to prevent depression or depressive state while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in particular hepatic and/or renal toxicity. In the context of the present invention, the term "depression" is understood to refer to a constellation of symptoms having, on the one hand, a psychological aspect consisting of mood disorders with pessimism, moral suffering, thoughts of death or suicide, mental inhibition, and on the other hand, a physical aspect of motor deficit, consisting in particular of a slowdown in motor activity, of appetite disturbances, of constipation, of sleep disturbances and of weight-control disturbances. Depression therefore corresponds to a pathological psychological state combining a

painful mood-alteration and a reduction in mental and motor activity. The term "depressive state" is understood to refer to a mental state characterized by a decline in neuropsychological tonicity, manifesting as lassitude, tendency to fatigue, discouragement and tendency to pessimism sometimes accompanied by anxiety.

5 Furthermore, the object of the present invention concerns more specifically the use of a mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, for the preparation of a drug intended to prevent or to treat fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in
10 particular hepatic and/or renal toxicity. Fibromyalgia syndrome is a chronic syndrome characterized by a feeling of pain and burning with morning stiffness mainly affecting articular and peri-articular fibrous tissues, and by a feeling of deep fatigue. Fibromyalgia includes a constellation of symptoms. The most frequent are non-restorative sleep, headache, digestive disturbances, depressive state, muscle spasm, facial pain, numbness
15 etc. Chronic fatigue syndrome is characterized by a state of exhaustion or of fatigue. The most common symptoms are a state of weakness, spasms and/or muscle pain, excessive need for sleep, fever, angina, memory loss and/or difficulty concentrating, insomnia, depression.

In addition, the object of the present invention concerns more specifically the use
20 of a mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, for the preparation of a drug intended to prevent or to treat pain and in particular chronic pain while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in particular hepatic and/or renal toxicity. Pain may be associated with various disorders and/or wounds. It
25 may be acute or chronic. Epidemiological studies have demonstrated the relations between states of chronic pain and anxiety and depression. Thus, patients suffering from chronic pain may develop emotional problems that lead to depression, and, in the worse cases, to a suicide attempt. A patient is considered to be in chronic pain if he/she complains of suffering for a period of more than six months. Among the various forms
30 of chronic pain, the following should be mentioned by way of example, but not limited to these: pain associated with fibromyalgia and/or arising in fibrous tissues, muscles,

tendons, ligaments and other sites, abdominal pain and diarrhea in irritable bowel syndrome, as well as lower back pain.

In addition, the object of the present invention concerns more specifically the use of a mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, for the preparation of a drug intended to prevent or to treat urinary incontinence and in particular urinary incontinence related to stress and enuresis, while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or while limiting organ and/or tissue toxicity, in particular hepatic and/or renal toxicity.

Prophylactic and therapeutic treatment of the abovementioned disorders is achieved by administering to an animal, preferably to man, a therapeutically-effective quantity of a mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, alone or in association with at least one other active substance. In most cases, this concerns man, however the treatment is also adapted to animals, in particular breeding animals (livestock, rodents, poultry, fish,...) and to domestic animals (dogs, cats, rabbits, horses,...).

The mixture of enantiomers, enriched in the (1S,2R) enantiomer, of milnacipran and/or of at least one of its metabolites, as well as their pharmaceutically-acceptable salts, as previously described, is advantageously administered to patients receiving simultaneously, separately or staggered in time at least one other active compound in the treatment of the abovementioned disorders.

Preferentially, the object of the present invention also includes, for use as a drug:

- a) the mixture of enantiomers enriched in the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and
 - b) at least one active compound chosen among the psychotropics, in particular antidepressants, and antimuscarinic agents,
- as associated products for use simultaneously, separately or staggered in time in the treatment or the prevention of depression, in particular deep depression, resistant depression, depression in the elderly, psychotic depression, depression induced by treatment with interferon, depressive state, manic-depressive syndrome, seasonal

depressive episodes, depressive episodes related to general health status, depressive episodes related to mood-altering substances.

The term "psychotropic" is understood to designate a substance of natural or artificial origin capable of modifying mental activity and whose action is essentially exerted on the central nervous system and the psychological state. Psychotropics are divided into three groups: 1) psycholeptics (hypnotics, neuroleptics and anxiolytics), 2) psychoanaleptics (antidepressants and psychotonics) and 3) psychodysleptics (hallucinogenics).

Preferentially, the said psychotropic is an antidepressant. By way of example, but not limited to these, the antidepressant is chosen among (i) monoamine oxidase inhibitors (MAOIs) such as iproniazid, pargyline, selegine, (ii) 5HT_{1D}-agonists such as sumatriptan, adrenaline and noradrenaline (alpha and beta sympathomimetics) (iii) tricyclic antidepressants, such as imipramine, clomipramine, (iv) selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) such as fluoxetine, (v) selective noradrenaline reuptake inhibitors, such as for example tandamine, fluparoxan, mirtazapine (vi) serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors, such as venlafaxine and duloxetine. By way of example, but not limited to these, the antimuscarinic agent is chosen among tolterodine, propiverine, oxybutynin, trospium, darifenacine, temiverine, ipratropium.

Preferably, the object of the present invention also includes for use as a drug:

- a) the said mixture of enantiomers enriched in the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and
- b) at least one other active substance chosen among the active compounds inducing organ toxicity and the active compounds inducing tissue toxicity, in particular hepatic and/or renal toxicity or with one or more active substances intended for treatment of hepatic or renal insufficiency, as associated products for use simultaneously, separately or staggered in time in the treatment or the prevention of conditions or disorders that can be managed by double inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake.

Preferably, the object of the present invention also includes, for use as a drug:

- a) the said mixture of enantiomers enriched in the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and
- b) at least one other active substance chosen among active compounds inducing cardiovascular side-effects or compounds given to treat a heart condition,

as associated products for use simultaneously, separately or staggered in time in the treatment or the prevention of conditions or disorders that can be managed by double inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake.

Advantageously, the cardiovascular side-effects induced are those mentioned previously, and more specifically, arterial hypertension, hypotension, cardiac rhythm disorders (tachycardia, bradycardia, palpitations).

The object of the present invention also includes pharmaceutical compositions containing the associated products previously described.

In the context of the present invention, the mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, is advantageously administered, but not in a limited manner, via the oral route, the nasal route, the transdermal, rectal, intestinal or parenteral route, by intramuscular, subcutaneous or intravenous injection, alone or in association with other active substances, as previously described.

When administered alone, the mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, may be administered *per se* or in the form of a pharmaceutical composition in which the said mixture of enantiomers or of their pharmaceutically-acceptable salts, is combined or mixed with one or several media, pharmaceutically-acceptable excipients and/or diluents, particularly to enhance bioavailability.

When the mixture of enantiomers in accordance with the invention, and preferentially the substantially-pure (1S,2R) F2695 enantiomer of milnacipran, is administered in association with other active substances, the said mixture and the other active substances may be formulated as a mixture or separately in an identical or different form. They may be administered via the same or a different route.

The pharmaceutical compositions in accordance with the invention may be formulated in a conventional manner well-known to the person skilled in the art using one or more physiologically-acceptable media including excipients, adjuvants and additives such as for example preservatives, stabilizers, wetting agents or emulsifiers.

5 The method of formulation chosen depends on the desired route of administration.

In the context of administration by injection, an aqueous solution is advantageously used, in particular a physiologically-acceptable buffer solution, such as Hank's solution, Ringer's solution or physiological saline solution. In the context of transdermal administration or via the mucous membranes, penetrating agents

10 appropriate to the mucous membrane to be crossed are advantageously used. Such penetrating agents are well known to the person skilled in the art. In the context of oral administration, the pharmaceutical compositions in accordance with the invention are advantageously administered in unit-dose or multiple-dose administration forms in mixtures containing appropriate pharmaceutical media known to the person skilled in

15 the art. Appropriate unit-dose administration forms include in particular tablets, possibly scored, capsules, powders, granules, oral solutions or suspensions, and aerosols. Appropriate multiple-dose administration forms include in particular drinkable drops, emulsions and syrups.

In the preparation of tablets, the mixture of enantiomers in accordance with the

20 invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, is formulated with a pharmaceutically-acceptable vehicle such as in particular polyvinylpyrrolidone, carbopol gal, polyethylene glycol, gelatine, talc, starch, lactose, magnesium stearate, gum arabic or their analogs. By way of example, the tablet contains the following excipients: calcium hydrogen phosphate dihydrate, calcium carmellose, povidone K30, anhydrous

25 colloidal silicon dioxide, magnesium stearate, talc. The tablets may also be coated, that is to say, covered with several coats of various substances such as saccharose in order to facilitate swallowing or preservation. The coating may also contain dyes or colorants in order to differentiate and to characterize the tablets with regard to their dosage strength, for example. The tablets may also be presented in a more or less complex formulation

30 intended to modify the rate of release of the active substance. Release of the active substance of the said tablet may be rapid, sustained or delayed depending on the desired

absorption. Thus, the mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, may be prepared in a pharmaceutical form for sustained release obtained according to the process described in patent EP 939 626. This pharmaceutical form is presented in the form of multiparticles
5 containing a large number of mini-granules and has a certain release profile *in vitro*.

Release of the mixture of enantiomers in accordance with the invention may be delayed and/or controlled by using an implant or by transdermal delivery, in particular subcutaneous or intramuscular, by intramuscular injection or by a transdermal patch. The said mixture is then formulated, in particular, with appropriate hydrophobic or
10 polymeric substances and ion-exchange resins.

The quantity of the mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the substantially-pure F2695 enantiomer, to be administered to the patient depends on the condition to be treated, the desired effect, in particular a therapeutic or prophylactic effect, the health status and age of the patient, in particular his/her medical
15 history of cardiovascular disease, the conditions of treatment and the method of administration of the drug. The quantities required to be administered for effective therapeutic or prophylactic use in a human patient can be determined based on animal models or on data, known to the person skilled in the art, obtained during the treatment of depression in man, for example, using a racemic mixture of milnacipran.

20 In the context of therapeutic and/or prophylactic treatment of the disorders mentioned above, and in particular depression, depressive states, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome, pain, the drug in accordance with the invention is advantageously administered at doses from 0.01 mg to 10 mg/kg body weight per day in one or more intakes, more advantageously at doses from 0.05 mg to 5 mg/kg body weight per day in
25 one or more intakes, and even more advantageously at doses from 0.1 mg to 1 mg/kg body weight per day in one or more intakes. In a particularly advantageous manner, administration of the said medicinal product at such doses as those defined above is divided into two daily intakes, preferentially in capsule form. By way of example, the mixture of enantiomers in accordance with the invention, preferentially the
30 substantially-pure F2695 enantiomer, is advantageously administered in the form of a

capsule containing approximately 6.75 mg of active substance per capsule, 12.5 mg/capsule, 25 mg/capsule, 50 mg/capsule.

Other characteristics, aims and advantages of the invention will become apparent in the examples that follow. The invention is not limited to these particular examples which are provided simply by way of example and which should be read in comparison with the following figures :

FIGURES

Figure 1 : Change in heart rate following single administration (delta values).

*** : $p \leq 0.001$ versus deionized water
 ** : $p \leq 0.01$ versus deionized water
 * : $p \leq 0.05$ versus deionized water
 Δ : $p \leq 0.05$ versus F2207

Figure 2 : Change in heart rate after single administration (absolute values).

*** : $p \leq 0.001$ versus deionized water
 ** : $p \leq 0.01$ versus deionized water
 * : $p \leq 0.05$ versus deionized water
 Δ : $p \leq 0.05$ versus F2207

Figure 3 : Effects of various treatments on mean values of diastolic blood pressure (mean values over 6 hours following the last intake, after 5 consecutive days of treatment).

Figure 4 : Effects of various treatments on mean values of systolic blood pressure (mean values over 6 hours following the last intake, after 5 consecutive days of treatment).

Figure 5 : Schematic representation of the method of calculation of the Toxicity Index. The Toxicity Index is the sum of all up- and down-regulated genes (in relation to the Induction Factor defined by the user)

Figures 6a, 6b, 6c: MTT assay on primary rat hepatocytes.

The concentrations are expressed in μM .

EXAMPLES

5 **EXAMPLE No. 1 : Pharmacokinetic studies on milnacipran and on its enantiomers**

Pharmacokinetic studies on milnacipran hydrochloride (F2207) and on its enantiomers (F2695 and F2696) were performed in various animal species and in man.

10 In animals, the pharmacokinetics of each enantiomer were studied following administration of the racemate or of one single enantiomer. Plasma concentrations of the F2695 and F2696 enantiomers are approximately equivalent in the animal species tested (monkey and rat).

15 A pharmacokinetic study in man involving 12 healthy subjects was performed by administering the racemate or one of the two enantiomers alone. It was shown that the pharmacokinetic profile of each enantiomer is independent of whether it was administered separately or in the form of the racemate, indicating the absence of interaction between the enantiomers (**Table 1**).

20 **Table 1: Table of the main pharmacokinetic variables of milnacipran hydrochloride (F2207) and its two enantiomers F2695 et F2696.**

C_{max} : Maximal plasma concentration directly estimated based on experimental data

T_{max} : Time to reach maximal plasma concentration

25 AUC_{0→∞} : Area under the curve for plasma concentrations in relation to time extrapolated to infinity

T_{1/2} : Terminal half-life of decrease in plasma concentrations

Dose administered (mg)	F2207 (50 mg)		F2695 (D) (25 mg)	F2696 (L) (25 mg)
	F2695 (D)	F2696 (L)		
C _{max} (nmol.l ⁻¹)	214	179	216	212

Tmax (hours)	3.42	2.87	3.08	2.21
AUC 0-∞ (nmol.h.l⁻¹)	2896	1563	2869	1543
T $\frac{1}{2}$ (hours)	9.28	5.75	9.38	5.58

These findings indicate that no biotransformation of the F2695 or F2696 enantiomers was detected in the species studied.

5

EXAMPLE No. 2 : Biochemical studies of milnacipran and of its enantiomers

The two enantiomers (F2695 and F2696) of milnacipran hydrochloride (F2207) were studied *in vitro* on uptake of noradrenaline and serotonin as well as on binding of paroxetine in the rat brain.

10

2. 1. MATERIALS AND METHODS

2.1.1. Noradrenaline uptake by a homogenate (P₂) of rat hypothalamus

Preparation of P₂

Male Sprague-Dawley rats, from 200 to 300 g, were stunned and decapitated, and the hypothalami were rapidly removed. Two hypothalami are homogenized in 4 ml of sucrose 0.32 M on Potter S by 16 complete passes back and forth at 800 rpm, then centrifuged for 10 min at 1000 g to eliminate cell debris. The supernatant is centrifuged for 20 min at 10 000 g and the P₂ thus obtained is recovered in 4 ml of sucrose 0.32 M and homogenized on a Dounce.

20

Uptake

³H-(1)-NA: 13 Ci/mmol (Amersham) is used.

Uptake takes place in a phosphate buffer (containing 8 g of NaCl, 1.21 g of K₂HPO₄ and 0.34 g of KH₂PO₄ per liter) pre-oxygenated 30 min before use with a mixture of O₂/CO₂ (95% / 5%).

25

In 5-ml plastic tubes placed in a water bath at 37°C, the following are introduced:

- 100 µl of buffer or inhibitor,
- 700 µl of buffer (containing 25 µM of pargyline),

- 100 µl of P₂.

After temperature balance, the reaction begins by the addition of 100 µl of ³H-NA, 50 nM final concentration.

Exactly 10 min later, the reaction is stopped by adding 2.5 ml of chilled buffer and filtering through GF/F filters. The tube is then rinsed once and the filter once with 2.5 ml of chilled buffer. The filter is then introduced into a Beckman mini-vial and, after adding 3 ml of Instagel (Packard) liquid scintillator, radioactivity is measured with a Tricarb Packard liquid scintillation counter.

Nonspecific uptake (NS) is measured as the presence of DMI 10⁻⁵ M.

The percentage of inhibition is calculated using the formula:

$$\frac{(\text{total uptake} - \text{NS}) - (\text{uptake in the presence of inhibitor} - \text{NS})}{(\text{total uptake} - \text{NS})}$$

The IC₅₀ is determined graphically on the mean curve of percentage inhibition (4 assays) in relation to the log of the concentration of inhibitor.

2.1.2. Serotonin uptake

The method was developed following that of Gray and Whittaker (1962, *J. Anat.*, 96 : 79-97). After homogenization of brain tissue in a sucrose solution, the presynaptic terminals break away from the axon and close to form synaptosomes obtained by subcellular fractionation.

Male Sprague-Dawley (Janvier) rats weighing 180-200 g were used. After sacrifice of the animal, the hypothalamus was removed, weighed and homogenized on a Dounce in 0.32 M sucrose at 0°C.

This homogenate was centrifuged for 10 min at 1000 g (2400 rpm – Hettich, Rotenta). The supernatant was recovered and centrifuged for 20 min at 10 000 g (8000 rpm – Beckam, model J2-21 M: rotor J14). The residue (called the P₂ fraction) was recovered in sucrose at a concentration of 50 mg/ml.

The following were incubated for 5 min at 37°C:

- 350 µl of chilled buffer (NaCl 136 mM, KH₂PO₄ 2.4 mM, K₂HPO₄ 6.9 mM, pH 7.2) preoxygenated 30 min before,
- 50 µl of membranes (5 mg/ml finally),
- 50 µl of citalopram (10⁻⁵ M finally) for nonspecific uptake,

- 50 µl of ^3H -5-HT (50 nM finally) (NEN, France, 28.4 Ci/mmol).

Exactly 5 min after the start of incubation, the reaction was stopped by vacuum filtration on Whatman GF/F filters (predilution with 2.5 ml of chilled buffer then rinsing with 3 times 2.5 ml).

5 The radioactivity collected on the filter was measured (Packard Tricarb 4640) by liquid scintillation with Emulsifier-Safe (Packard).

The IC_{50} were determined by transposing the percentages of inhibition onto a graph in relation to the log of the product concentration (6 concentrations in duplicate).

2.1.3. Paroxetine binding

10 Male Sprague-Dawley rats (Janvier) weighing 180-200 g were used. The hypothalami of several rats were collected and homogenized in 5 ml of chilled buffer (50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7.5) on a Dounce, and the homogenate was centrifuged at 30 000 g (27 000 rpm – Beckman. L5-50E, rotor T40) for 10 min. The residue obtained was recovered in 5 ml of buffer and recentrifuged
15 under the same conditions. The new residue was recovered in the same buffer and finally rehomogenized on a Dounce at a tissue concentration of 10 mg/ml. The membrane suspension (100 µl) was incubated with ^3H -paroxetine (NEN, France, 28.6 Ci/mmol) at a concentration (final) of 0.1 nM, at 20°C, in a final volume of 1 ml for 2 h. After 2 h incubation, the reaction was stopped by vacuum filtration on Whatman
20 GF/F filters pretreated in a 0.05% solution of polyethylenimine 30 min beforehand (prediluted with 4 ml of chilled buffer, then the tube was rinsed 2 times 4 ml). Radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry (Packard, Tricarb 4640) using Emulsifier-Safe (Packard) as the scintillating agent.

25 Specific ^3H -paroxetine binding was defined as the difference between total binding and that remaining in the presence of 10 µM of fluoxetine.

The IC_{50} were determined by transposing the percentages of inhibition onto a graph in relation to the log of the concentration of the product (6 concentrations in duplicate).

2.1.4. Products used

30 F2207 : batch No. 10-CTN3 Key P118

F2695 : batch No. PL-I-205

F2696 : batch No. PL-I-204C.

2.2. RESULTS

The effects of F2207 and of its two enantiomers on uptake of noradrenaline and serotonin and on paroxetine binding are shown on a graph with the percentage of inhibition in relation (%) on the ordinate and the concentration (M) of F2207, F2695 and F2696 on the abscissa (data not shown). The values for the percentages of inhibition corresponding to each product concentration, tested in duplicate, are mean results of four separate experiments.

The values of the IC_{50} for the three products were determined on the basis of these curves and are shown in Table 2.

Table 2 : Inhibition of 3H -noradrenaline, 3H -serotonin uptake and 3H -paroxetine binding

Compounds	IC_{50} (M)		
	Uptake		3H -Paroxetine binding
	3H -Noradrenaline	3H -Serotonin	
F2695	1.5×10^{-8}	4.6×10^{-8}	6.0×10^{-8}
F2207	3.0×10^{-8}	15×10^{-8}	13×10^{-8}
F2696	75×10^{-8}	60×10^{-8}	70×10^{-8}

The three compounds were active in these three pharmacological assays, however differences were present:

- in noradrenaline uptake:

F2695 was two times more active than F2207.

F2695 was 25 times more active than F2696.

- in serotonin uptake:

F2695 was 3 times more active than F2207.

F2695 was 12 times more active than F2696.

- in paroxetine binding:

F2695 was 2 times more active than F2207.

F2695 was 10 times more active than F2696.

The three compounds were active in these pharmacological assays with however a lesser activity for the (1R,2S) form (F2696) and the racemate (F2207). The (1S,2R) form of milnacipran (F2695) was 2 to 3 times more active than F2207.

EXAMPLE No. 3 : Comparative activity of racemic milnacipran hydrochloride (F2207) and of its active (1S,2R) enantiomer (F2695) by the oral route on heart rate and blood pressure in the waking dog.

3.1. INTRODUCTION

Thus study was designed to study the effects of F2207 and of F2695 a) on heart rate after a single administration by the oral route (n = 28 dogs), and b) on systolic and diastolic blood pressure after repeated administration for 5 days by the oral route in dogs (n = 6 dogs).

This study was conducted at equally pharmaceutically-active doses of F2207 and F2695 in female animals equipped with implants (Data Sciences International) allowing for data on heart rate and blood pressure parameters to be captured by telemetry. For every study, the animals were allocated to 3 treatment groups:

- group 1 (control) treated with deionized water,
- group 2 treated with F2207 at a dose of 20 mg/kg/day,
- group 3 treated with F2695 at a dose of 10 mg/kg/day.

3.2. METHODOLOGY

Given the small number of simultaneously equipped animals (maximum 8), the number of recording lanes of the equipment used (8 lanes), and in order to constitute homogeneous treatment groups, the overall evaluation was performed in four studies, each study being divided into three series (treatment of each animal with each of the three products), separated by a wash-out period with reinitialization of the probes. Each series is itself performed in two phases :

- a first phase during which all the animals are treated with deionized water in order to adapt them to containment and to oral treatment with stomach tubing,

- a second phase during which the animals receive their respective treatment (single administration for the heart rate, study Nos. 894/926/935/936 ; repeated administration for five days for blood pressure, study No. 894).

5 The overall experimental plan is described in the following table:

Table 3: Overall experimental plan for the telemetry study on the effects of racemic milnacipran hydrochloride (F2207) and of its active (1S,2R) enantiomer (F2695) administered orally in conscious dogs.

GROUP NUMBER	1	2	3
<u>ANIMALS</u>			
Number	27	28	28
Identification	1-2-7-8-13-14 (study 894)	3-4-9-10-15-16 (study 894)	5-6-11-12-17-18 (study 894)
	1-2-7-8-13-14 (study 926)	3-4-9-10-15-16 (study 926)	5-6-11-12-17-18 (study 926)
	1-2-9-10 11-17-18-19 (study 935)	3-4-5-12 13-20-21-22 (study 935)	6-7-8-14 15-16-23-24 (study 935)
	1-2-9-10 11-17-18-19 (study 936)	3-4-5-12 13-20-21-22 (study 936)	6-7-8-14 15-16-23-24 (study 936)
<u>TREATMENT</u>			
Identification	Deionized water	F2207	F2695
Dose	-	20 mg/kg	10 mg/kg
Route oral		
Volume 5 ml/kg		

10 (*n* = 27 in the control group, the probe signal of animal No. 18 not having been recorded)

The effects of the various treatments on the heart rate were analyzed in the four studies after single administration. The analysis concerns the following 13 data-capture times:

- prior to single administration,
- every 30 minutes over 6 hours following single treatment.

The effects of the various treatments on blood pressure were analyzed in study No. 894 at the steady state, on D5, D29 and D33 (final effective day of treatment for each series).

The analysis concerns the following data-capture times:

- 5 - prior to treatment,
- every 30 minutes over 6 hours following treatment.

3.3. RESULTS

3.3.1. With regard to heart rate (four studies pooled), a Tukey test was performed for the individual changes in frequency, for each of the 12 post-treatment experiments, versus
10 the pre-treatment value, as well as for the absolute heart rate values for each recording time.

The following observations were made in comparison with the control animals receiving deionized water:

when statistical analysis is performed on the change values (figure 1):

- 15 - a significant increase in heart rate from the first 1/2 hour following single administration of F2207 (20 mg/kg), a persistent increase up to 5.5 hours after treatment ($p \leq 0.001$ for the entire capture time, with the exception of the times 0.5 and 5.5 hours - $p \leq 0.01$ - and of the time 5.0 hours - $p \leq 0.05$ - after treatment),
- 20 - an increase in heart rate after the administration of F2695 which still remains less than that obtained after administration of F2207. Furthermore, this difference between the effects of F2207 and F2695 is significant ($p < 0.05$) at 1 and 4 h after administration in favor of F2695,
- 25 - an increase in heart rate which lasts for a shorter period under F2695 (1.0 to 4.5 h) than under F2207 (persists up to 5.5 h after treatment).

when statistical analysis is performed on absolute heart rate values, this same study demonstrates (figure 2):

- 30 - a significant increase in heart rate from the first hour following single administration of F2207 (20 mg/kg), a persistent increase up to 5.5 hours after treatment ($p \leq 0.001$ for the entire capture time of 1.0 to 4.5 hours, with the

exception of the time 3.5 hours - $p \leq 0.01$; and $p \leq 0.01$ for the capture time 5.5 hours after treatment),

- an increase in heart rate after the administration of F2695 which still remains less than that obtained after administration of F2207. Furthermore, this difference between the effects of F2207 and F2695 is significant ($p < 0.05$) at 1 and 4 h after administration in favor of F2695,
- an increase in heart rate which lasts for a shorter period under F2695 (1.0 to 4.5 h) than under F2207 (persists up to 5.5 h after treatment).

3.3.2. With regard to blood pressure (one study of repeated administration), one mean value for diastolic blood pressure (Figure 3 and Table 4), as well as one mean value for systolic blood pressure (Figure 4 and Table 5) were calculated for each dog and for the 6 hours following the final treatment, after 5 consecutive days of administration. These mean blood pressure values were analyzed by ANOVA followed by a Tukey test when ANOVA permitted such a test (data not shown).

The following were observed :

- a significant increase ($p \leq 0.001$) in diastolic blood pressure after repeated administration of F2207 for 5 days (20 mg/kg/day) or of F2695 (10 mg/kg/day) compared to treatment with deionized water,
- a significant difference ($p \leq 0.05$) in the mean diastolic blood pressure value after repeated administration of F2207 (20 mg/kg/day) for 5 days compared to the mean diastolic blood pressure value after repeated administration of F2695 (10 mg/kg/day),
- no significant effect on systolic blood pressure; it should be noted however that the values for sBP after repeated administration of F2695 for 5 days are close to the values for sBP following treatment with deionized water.

Individual diastolic and systolic blood pressure data are shown in Tables 4 and 5 respectively.

Table 4: Individual diastolic blood pressure data

DIASTOLIC BLOOD PRESSURE (dBP expressed in mmHg)

Individual data after repeated administration for 5 consecutive days

GROUP	1								2								3							
	VEHICLE								F2207 (20 mg/kg/d)								F2695 (10 mg/kg/d)							
TREATMENT	1	2	7	8	13	14	M	SEM	3	4	9	10	15	16	M	SEM	5	6	11	12	17	18	M	SEM
Animal N°	79	77	73	77	101	76	81	4	112	89	93	88	86	91	93	4	73	89	80	71	76	78	78	3
Time before treatment																								
Time after treatment (h)																								
0.50	84	76	70	63	80	70	74	3	103	106	96	92	88	87	95	3	91	91	99	90	108	85	94	3
1.00	82	84	77	72	72	76	77	2	130	117	113	113	90	106	112	5	112	96	75	97	87	96	94	5
1.50	102	81	79	75	82	68	81	5	131	127	137	96	100	91	114	8	109	83	88	97	87	112	96	5
2.00	83	75	71	98	77	75	80	4	123	113	99	88	107	109	107	5	115	88	93	95	84	109	97	5
2.50	85	75	75	84	85	79	81	2	137	111	116	101	115	107	115	5	111	88	97	89	92	107	97	4
3.00	91	95	99	85	79	84	89	3	121	118	112	116	106	92	111	4	104	91	96	96	100	106	99	2
3.50	83	72	78	73	77	65	75	3	120	106	133	116	103	103	114	5	96	106	94	107	77	103	97	5
4.00	81	79	75	77	82	68	77	2	133	114	105	111	110	103	113	4	125	91	99	108	80	109	102	6
4.50	82	76	91	84	113	85	89	5	135	110	126	109	104	108	115	5	103	104	92	100	85	108	99	3
5.00	97	79	67	95	81	82	84	5	116	120	98	97	97	105	106	4	126	100	92	95	110	102	104	5
5.50	94	80	70	ND	85	82	82	4	103	107	115	106	92	93	103	4	88	86	105	98	89	99	94	3
6.00	83	74	82	82	78	77	79	1	115	133	120	104	103	104	113	5	101	113	98	105	109	108	106	2
Mean dBp after treatment	87	79	78	81	83	76	81	2	122	115	114	104	101	101	110	4	107	95	94	98	92	104	98	2

ND: not determined

Table 5: Individual systolic blood pressure data

SYSTOLIC BLOOD PRESSURE (sBP expressed in mmHg)
Individual data after administration for 5 consecutive days

GROUP	1														2												3													
TREATMENT	VEHICLE														F2207 (20 mg/kg/d)												F2695 (10 mg/kg/d)													
Animal N°	1	2	7	8	13	14	M	SEM	3	4	9	10	15	16	M	SEM	5	6	11	12	17	18	M	SEM	136	141	138	130	134	149	138	3								
Time before treatment	139	141	120	157	172	138	145	7	188	164	176	149	130	169	163	8	136	141	138	130	134	149	138	3	136	141	138	130	134	149	138	3								
Time after treatment (h)																																								
0.50	135	132	119	131	149	138	134	4	158	154	152	128	126	129	141	6	135	129	140	135	160	139	140	4	135	129	140	135	160	139	140	4								
1.00	134	158	129	144	141	143	142	4	180	167	157	150	126	130	152	9	159	135	124	148	131	143	140	5	159	135	124	148	131	143	140	5								
1.50	158	151	145	150	153	137	149	3	186	181	189	129	136	138	160	12	164	119	138	158	127	156	144	8	164	119	138	158	127	156	144	8								
2.00	138	136	145	173	151	144	148	5	171	160	146	122	140	163	150	7	168	125	135	141	127	156	142	7	168	125	135	141	127	156	142	7								
2.50	142	143	145	159	160	148	150	3	195	168	168	144	153	161	165	7	165	124	142	141	134	154	143	6	165	124	142	141	134	154	143	6								
3.00	149	167	162	163	150	154	158	3	173	177	164	157	141	146	160	6	156	131	145	144	151	157	147	4	156	131	145	144	151	157	147	4								
3.50	135	129	149	154	153	137	143	4	165	153	184	167	139	155	161	6	146	147	141	169	123	156	147	6	146	147	141	169	123	156	147	6								
4.00	142	143	149	166	164	144	151	4	180	157	151	154	150	153	158	5	180	132	145	160	124	164	151	9	180	132	145	160	124	164	151	9								
4.50	137	140	159	170	190	152	158	8	184	161	180	155	145	168	166	6	158	151	138	163	131	163	151	5	158	151	138	163	131	163	151	5								
5.00	150	146	127	177	160	145	151	7	161	171	146	141	139	166	154	6	182	144	137	150	162	158	156	6	182	144	137	150	162	158	156	6								
5.50	153	149	132	ND	148	144	145	4	151	154	173	152	132	155	153	5	142	127	152	153	141	153	145	4	142	127	152	153	141	153	145	4								
6.00	146	144	151	176	146	143	151	5	158	192	171	154	148	172	166	7	156	170	148	159	160	166	160	3	156	170	148	159	160	166	160	3								
Mean dBP after treatment	143	145	143	160	155	144	148	3	172	166	165	146	140	153	157	5	159	136	140	152	139	155	147	4	159	136	140	152	139	155	147	4								

ND: not determined

3.4. CONCLUSION

Under the experimental conditions of the present evaluation carried out in four successive studies by oral administration in the waking dog equipped with a telemetric device:

5 • on single administration and compared to the control group ($n = 28$), the increase in heart rate was clearly significant and lasting with F2207 at a dose of 20 mg/kg/day; it is statistically and clinically reduced and more fleeting with F2695 at the equally pharmacologically-active dose of 10 mg/kg/day.

10 • F2695, at a dose of 10 mg/kg/day, did not induce any statistically significant change in mean systolic blood pressure over the 6 hours following the final treatment, at the steady state after repeated administration for 5 days,

15 • a statistically significant difference was evidenced in mean diastolic blood pressure over the 6 hours following the final treatment, at the steady state after repeated administration for 5 days, between the active F2695 enantiomer (98 ± 2 mm Hg) and the F2207 racemic at equally pharmaceutically-active doses (110 ± 4 mm Hg).

These differences clearly demonstrated greater cardiovascular tolerability of the active F2695 enantiomer.

EXAMPLE 4 : GENOMIC TEST OF PREDICTIVE TOXICOLOGY *IN VITRO*

20 4.1. MATERIALS AND METHODS

The F2695 and F2696 compounds, enantiomers of the racemic molecule F2207, as well as clomipramine, a reference product, (coded C218 in the study) were assessed in the present study. The two enantiomers, F2695 and F2696, were first assessed in a preliminary cytotoxicity test (MTT assay) on primary rat hepatocytes, in order to select
25 the three concentrations to be used in the final test.

After treatment of the primary rat hepatocytes in culture, the RNA was extracted in order to generate labeled complementary-DNA probes which were then hybridized on a membrane containing 682 alternatively-spliced fragments specific to cell stress. A Toxicity Index was obtained for each of the products by comparing the hybridization
30 profile of the treated cells with that of the untreated cells.

4.1.1. Purpose and aim of the study

Safe-Hit is a genomic test for predictive toxicopharmacology that is sensitive, robust, reliable, rapid and sure, enabling products to be compared and ranked on the basis of optimized assessment of their toxic potential.

5 Safe-Hit uses technology, the property of EXONHIT (DATASTM: *Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing*), that permits isolation and, consequently, cloning of splicing events that result from a given biological state, in comparison with a control condition. This allows mRNA isoforms, differentially expressed depending on the biological conditions, to be isolated.

10 Safe-Hit allows molecules within a chemical series to be ranked according to a Toxic Index, determined after the following basic steps (systematically performed in duplicate for each product):

- treatment of the cell lines with the various products at three different concentrations, deduced from a preliminary cytotoxicology test (MTT assay): a
15 reference concentration corresponding to 80% cell viability, a concentration 10-fold higher – when possible – and a concentration 10-fold lower,
- preparation of total RNA and of the corresponding radiolabeled cDNA probes,
- hybridization of the cDNA probes: Safe-Hit macro-array containing
20 682 independent clones, corresponding to alterations in gene splicing induced by overexpression of WTp53 (p53 is the most ubiquitous “mediator” of cell stress, chosen from the development of this methodology),
- acquisition and determination of the Toxicity Index.

4.1.2. Cells

25 The cells used in the study (preliminary MTT assay of cytotoxicity and the main test) are cryopreserved hepatocytes from Sprague-Dawley rats in primary culture (batches Hep184005 and Hep184006 - Biopredic), cultured under standard conditions.

4.1.2.1 Culture medium

- *thawing medium*: Leibovitz 15 medium with glutamax 1, to which were added
30 100 IU/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin and 0.6 M of glucose (batch MIL 210009 –Biopredic),
- *seeding medium*: Williams E medium with glutamax 1, to which were added

100 IU/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 4 µg/ml of bovine insulin and 10% v/v fetal calf serum (batch MIL 260005) – Biopredic),

- *incubation medium*: Williams E medium with glutamax 1, to which were added 100 IU/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, 4 µg/ml of bovine insulin and 50 µM of hydrocortisone hemisuccinate (batch MIL 260009-260007 – Biopredic).

4.1.2.2 Culture conditions

37°C, CO₂ atmosphere (5%), relative humidity (95%).

4.1.2.3 Culture procedure

	Cell toxicity test	Main study
	Cells were seeded on the day of treatment	
Seeding density	35 000 cells / well (96 wells per plate)	1.5 million cells per 30 mm plate
Medium volume	0.1 ml	3 ml

4.1.3. Cytotoxicity test

The cytotoxicity test (MTT assay) detects live cells by use of a colorimetric reaction that reveals the integrity of cell respiration implying activity of the mitochondria. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), soluble in water, is transformed by splitting, under the effect of a mitochondrial enzyme in live cells, into insoluble purple formazan. Formazan is solubilized in an organic solvent and the solution obtained can be measured by spectrophotometry. The absorbance measured is proportional to the number of surviving cells.

The cells are put into contact with the product to be tested at 5 different concentrations (0 – 1 – 10 – 25 – 50 and 100 µM) for 16 hours.

After this period of exposure, an MTT solution (0.5 mg/ml in the incubation medium of the primary hepatocytes) is added for 3 hours. After solubilization of the formazan crystals, the multi-well plates are read with a spectrophotometer at 500 nm in order to determine the percentage of cell viability.

4.1.4 Main genomic pharmacotoxicology test

The main study is performed in duplicate, using seeded cultures exposed to each product in order to enhance consistency between the experiments and to validate the

results obtained.

4.1.4.1 Cell seeding and treatment

The cells are seeded and cultured for 16 hours with each product, at the three concentrations chosen on the basis of the preliminary MTT assay; two controls (untreated cells and solvent alone) are added to the series.

4.1.4.2 Total RNA extraction and assay

After treatment, the RNA is extracted and analyzed as follows:

- collection of cells and centrifugation,
- extraction performed with ready-to-use phenol reagent (Trizol – batches 1106266 and 1121067 – Invitrogen) according to the manufacturer's protocol,
- solubilization of the RNA in water,
- RNA assay by spectrophotometry (optical density measured at 260, 280 and 300 nm),
- verification of the quality of the RNA using Agilent.

4.1.4.3 Preparation of the cDNA probes

The cDNA probes are prepared by reverse radioactive transcription (alpha dATP ³³P – Amersham). The radioactive cDNA is quantified (Instant Imager - Packard) to ensure that the probes are active.

4.1.4.4 Hybridization on the Safe-Hit membrane

The 682 DATAS clones (alternately spliced patterns) are placed in duplicate on the Safe-Hit membranes, made of precut nylon (Q-BIOgene), with the aid of a Q-Pix apparatus (GENETIX). The DNA probes are hybridized on the membranes overnight and the membranes are washed.

4.1.4.5. Preparation of the cDNA:

- matrix: 5 µg of total RNA (for each treatment series and for each concentration),
- primer: 100 ng of oligo-dTV oligonucleotide, for the 1st and 2nd hybridizations in rats (batch 12.00, Invitrogen),
- main mixture:
 - 10 µl of First Strand 5x Premier buffer (batch 1131226 - Invitrogen)
 - 1 µl of dCTP+dGTP+dTTP 20 mM (batch 1105201 – Invitrogen)
 - 1 µM of ATP 120 µM (batch 1105201 – Invitrogen)
 - 5 µl of Dithiothreitol (DTT) 0.1 M (batch 133609 - Invitrogen)

1 µl of Out 40 U RNase (batch 1113345 – Invitrogen)
 5 µl of ³³P dATP 3 000 Ci/mmol 10 m Ci/µl (batch B0239 – Amersham)
 4 µl of Superscript II (batch 1137806 – Invitrogen)
 1 µl of glycogen (batch 1129328 – Invitrogen)

5 - **Procedure:**

Incubate the RNA and the oligo-dTV at 70°C for 10 minutes and then place it on ice. Add 27 µl of MasterMix and incubate at 43°C for 1 h then at 50°C for 15 minutes. Add 20 µl of water, then 20 µl of EDTA 50 mM, then 4 µl of NaOH 10N. Incubate for 20 minutes at 65°C then place on ice.

10 Quantification: Instant Imager, Packard: 1 µl of reaction mixture, add 8 µl of acetic acid, 100 µl of isopropanol and 1 µl of glycogen (20 µg/µl). Incubate at -20°C for 20 minutes, centrifuge for 20 minutes at 13 000 rpm at 4°C. Reconstitute as a suspension in 200 µl of water, quantification: Instant Imager, Packard: 1 µl of reaction mixture.

15 - **Media and buffers**

Common solutions:

20X SSC (Invitrogen)
 50X Denhardt's
 50 % (w/v) Dextran Sulfate (ICN)
 20 % SDS (v/v)(Quantum biotech.)
 10 mg/ml DNA from salmon sperm (Q-Biogene)

Prehybridization buffer:

6X SSC
 10X Denhardt's
 10 % Dextran Sulfate
 0.5% SDS
 H₂O

Hybridization buffer:

5X SSC
 5X Denhardt's
 0.1 % SDS
 H₂O

Washing buffer 1:

2X SSC

Washing buffer 2:

2X SSC
 0.1 % SDS

Washing buffer 3:

0.5X SSC
 0.1 % SDS

Washing buffer 4:

1X SSC
 0.1 % SDS

- Prehybridization:

Aliquot 5 ml of prehybridization buffer in the hybridization tubes,
add the corresponding volume of salmon-sperm DNA for a final
concentration of 100 µg/ml,
soak the membranes in 5X SSC,
place the membrane in the hybridization tube and prehybridize for 2 hours at
65°C.

- Hybridization:

Remove the prehybridization buffer and rinse with 10-20 ml of 5X SSC,
remove the 5 X SSC, replace with 5 ml of buffer + salmon-sperm DNA,
denature the RT probes for 5 min at 95°C, then place on ice for 1 minute,
centrifuge to reconstitute, then recover the appropriate volume of denatured
RT probes in the tube (100 000 to 200 000 cpm/ml), incubate overnight at
55°C.

- Washing:

Rinse the membranes with 10-20 ml of washing buffer 1,
remove the buffer and replace it with 50 ml of washing buffer 2,
incubate for 30 min at 35°C, then remove and replace while washing with
buffer 4, incubate for 30 min at 55°C, then pour off the final washing buffer,
remove the membranes from the tubes, place them on a cassette and allow
acquisition to continue for 3 hours.

4.1.4.6 Acquisition and Analysis of the image

The membranes are placed on a screen (FX Imaging ScreenK - Bio-rad)
for 3 hours. The film is then read using a Personal Molecular Imager FX (Bio-
rad). The image is analyzed using the Safe-Hit Reader Software (COSE).

4.1.4.7 Calculation of the Toxicity Index

All the data are transferred to an automatic calculation program that
normalizes the various membranes and calculates a Toxicity Index, equal to the
sum of the number of up- and down-regulated genes for a given compound at a
given concentration, in comparison with the results of the untreated controls. The
results of the two Safe-Hit analyses are then compared and combined to assess

the potential toxicity of the various compounds tested. Two parameters that can be modified by the user are involved in the calculation of the Toxicity Index:

• Background Threshold (BT) smoothes out weak signals, close to background noise and not attributable to significant gene expression. This therefore determines the threshold of detection;

• Induction Factor (IF) is determined as the multiplication factor, versus the control samples, for the clones to be up- or down-regulated. The value of this parameter is usually 2 or less than 2 in order to obtain relevant results. Progressively increasing the IF value selects those clones that are more and more strongly up- or down-regulated.

The procedure for calculating the Toxicity Index was developed by comparing the reference profiles (R: untreated cells) with an experimental profile (E) and goes through the following steps (see Figure 5 for a schematic overview of the procedure):

- transformation of all the values obtained into log values,
- calculation of the mean log value for each of the duplicate assays (M_{iR} and M_{iE}),
- creation of a matrix with $M_{iR} - M_{iE}$ for all the signals ($= D_i$),
- normalization of the individual M_{iE} values by subtracting from M_{iE} the median of the 14 proximal values of D_i ($= NM_{iE}$),
- comparison of the normalized values with the reference values ($C_i = NM_{iE} - M_{iR}$),
- exponential transformation of C_i ($= F_i$),
- comparison of F_i with the Induction Factor chosen by the user:
 - if $F_i > IF$, the gene is considered to be up-regulated,
 - if $1/IF < F_i < IF$, the gene is considered to be without change,
 - if $F_i < 1/IF$, the gene is considered to be down-regulated.

4.2. RESULTS OF THE MTT ASSAY

These assays were performed in triplicate on primary rat hepatocytes exposed for 16 hours.

Clomipramine, referred to as C218, showed marked toxicity at 100 μ M since no cell viability was observed after exposure of the cells for 16 hours. Conversely, no toxicity was observed at 25 μ M. At 50 μ M, cell viability greater than 80% is entirely compatible with a genomic pharmacotoxicology study. The F2695 and F2696 compounds show no cytotoxicity in this assay, even at a concentration of 100 μ M.

To perform the genomic pharmacotoxicological assessments, 3 concentrations of the same compound are used: the concentration which allows for 80% cell viability (C) to be obtained, as well as concentrations corresponding to $(C) \times 10$ and to $(C)/10$.

In order to compare the capacity of F2695 and F2696 to yield a score in the assay performed, the same concentrations were used in each test: 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M. Concentrations of 1 μ M, 10 μ M and 50 μ M were used for clomipramine. See Figures 6a, 6b and 6c.

4.3 RESULTS ON PRIMARY RAT HEPATOCYTES

Toxicity Indices (IT) were determined as described above. Only those clones which were found to be altered in relation to the control were taken into account in the two independent experiments, taking into consideration only those clones whose signal was two times higher than the background threshold (BT). Two separate analyses were performed using two levels of differentiation (Induction Factor - IF) in relation to the untreated controls:

- a factor of at least 1.7 in relation to the untreated controls. This factor of 1.7 times represents the weakest value that allows an index not to be obtained in relation to the two untreated controls.
- a factor of at least 2 in relation to the untreated controls. This factor of 2 times allows the most robust signals to be taken into account.

4.3.1. Induction factor of 1.7 in relation to the untreated controls (Table 6)

Table 6: Up- and down-regulated clones with primary rat hepatocytes (Induction Factor = 1.7 times)

	F2695 -1μM	F2695 -100μM	F2695- 100μM	F2696 -100μM	F2696 -100μM	C 218- 1μM	C 218- 10μM	C 218- 100μM
Up >1.7		1			15	2	2	13
Down <0.58		1	2	5	7	7	13	15
TI		2	2	5	22	9	15	28

Up
>1.7
Down
<0.58
8

Pos	No. U	No. D							Gene
A09	3					2.90	2.23	2.14	H. sapiens mitochondrion, 12S
A20		1			0.56				H. sapiens initiation factor eIF-5A gene
B20		2					0.14	0.27	H. sapiens chromosome 19, BAC CIT-B-191n6
B22		2					0.17	0.32	H. sapiens Genomic sequence from 17
C01	4				3.20	1.93	1.82	1.91	H. sapiens mitochondrion, 16S
E01	1							1.73	H. sapiens mRNA for lipocortin II
E05		2					0.22	0.35	H. sapiens DNA sequence from clone 740A11 on chromosome Xq22.2-23. Contains part of the COL4A5 gene for Collagen Alpha 5 (IV) Chain Precursor. Contains GSS1, complete sequence
E11	1				2.12				H. sapiens chlordecone reductase homolog liver, mRNA
E19	1							1.72	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
E21		2					0.56	0.58	H. sapiens ribosomal protein S14 gene
F24		1						0.52	H. sapiens LIM homeobox protein cofactor (CLIM-1) mRNA
G01	1							2.04	H. sapiens estrogen receptor-related protein (variant ER from breast cancer) mRNA
G05	1							2.02	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
G09	2				2.09			1.76	H. sapiens mitochondrion, cytochrome b
I01	1				2.05				H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
I18	2				2.38			1.88	H. sapiens 18S rRNA gene
L01	1				2.05				H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA
L22	1				1.78				H. sapiens mRNA for Lon protease-like protein

The following Toxicity Indices were obtained:

F2695	Toxicity Index
1 μ M	0
10 μ M	0
100 μ M	17

F2696	Toxicity Index
1 μ M	2
10 μ M	5
100 μ M	22

C218	Toxicity Index
1 μ M	9
10 μ M	15
50 μ M	28

5

The following ranking could thus be established, from the most to the least toxic:
C218 (clomipramine) > F2696 >>> F2695.

Clomipramine, the reference molecule, coded C218 in the present study, showed an increasing number of signatures with relation to the concentrations tested: respectively 9, 15 and 28 signatures at concentrations of 1, 10 and 50 μ M (maximal concentration defined in the preliminary cytotoxicity test). As one might logically expect, all the signatures that occurred at low and moderate concentrations are also found at higher concentrations.

At concentrations of 1 and 10 μ M, F2695 did not induce any of the 682 potential signatures of stress tested in the present study. At the highest concentration, 100 μ M, only two signatures were detected, one of which was common to C218, but whose signification was unknown.

F2696 showed an increasing number of signatures in relation to the concentrations tested: 2, 5 and 22 signatures respectively at concentrations of 1, 10 and 100 μ M. All of the signatures that occurred at the low and medium concentrations were detected at the higher concentrations. None of the 22 signatures was shared with F2695. Conversely, the signatures that appeared at the low and medium concentrations

(5 including the 2 which were present at the low concentration) were among the 5 that formed part of the 9 signatures detected with clomipramine starting with the low dose, 1 μ M. At the high concentration, 100 μ M, 10 of the 26 signatures of F2696 were detected among the 28 signatures identified with clomipramine at 50 μ M.

- 5 From the qualitative standpoint, the impact of F2696 and of clomipramine on mitochondrial transcripts, in particular on Cox1 and on cytochrome *b*, should be stressed. These signatures are not present with F2695 (G05/G09/I01 positions).

4.3.2. Induction Factor of 2 in relation to untreated controls (Table 7)

Table 7: Up- and down-regulated clones with primary rat hepatocytes (Induction Factor = 2 times)

	F2695-1µM	F2695-10µM	F2695-100µM	F2696-1µM	F2696-10µM	F2696-100µM	C218-1µM	C218-10µM	C218-100µM
Up						10	1	1	4
Down					5	6	7	12	12
Tl					5	16	8	13	16

Up >1.7
Down <0.588

Pos	No. U	No. D	Gene						
A09	3					2.90	2.23	2.14	H. sapiens mitochondrion, 12S
B20		2					0.14	0.27	H. sapiens chromosome 19, BAC CIT-B-191n6
B22		2					0.17	0.32	H. sapiens Genomic sequence from 17
C01	1								H. sapiens mitochondrion, 16S
E05		2					0.22	0.35	H. sapiens DNA sequence from clone 740A11 on chromosome Xq22.2-23. Contains part of the COL4A5 gene for Collagen Alpha 5 (IV) Chain Precursor. Contains GSS1, complete sequence
E11	1					2.12			H. sapiens chlorocone reductase homolog liver, mRNA
G01	1							2.04	H. sapiens estrogen receptor-related protein (variant ER from breast cancer) mRNA
G05	1							2.02	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
G09	1					2.09			H. sapiens mitochondrion, cytochrome b
I01	1					2.05			H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
I18	1					2.38			H. sapiens 18S rRNA gene
J03	1					2.12			H. sapiens CLP mRNA
L01	1					2.05			H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA
M07	1					2.25			H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1
M12		3				0.21		0.16	H. sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C1563
S01	1							2.98	Mus musculus TCR beta locus

T08			5						0.22	0.20	0.35	0.14	0.22	H. sapiens mRNA for KIAA1185 protein
U04			5						0.26	0.19	0.48	0.22	0.37	H. sapiens translation initiation factor eIF-2alpha mRNA
W17	1									2.96				H. sapiens mitochondrion, hypoxia inducible gene-14
X02			5						0.29	0.20	0.36	0.24	0.31	unk
X05			2									0.15	0.24	H. sapiens microsomal epoxide hydrolase (EPHX) gene
X06			5						0.20	0.16	0.23	0.15	0.23	H. sapiens Genomic sequence from 9q34
Y17	1									2.65				H. sapiens 28S ribosomal RNA gene
Z13			3								0.34	0.29	0.27	unk
AA11			3								0.38	0.27	0.31	H. sapiens Repeat sequence AluJb fragment inserted into a cDNA coding for an unknown protein
AC13			5						0.22	0.16	0.28	0.16	0.28	H. sapiens 7S RNA L gene

The following Toxicity Indices were obtained:

F2695	Toxicity Index
1 μ M	0
10 μ M	0
100 μ M	0

C218	Toxicity Index
1 μ M	8
10 μ M	13
50 μ M	16

F2696	Toxicity Index
1 μ M	0
10 μ M	5
100 μ M	16

According to these parameters, the following ranking could be put forward, from the most toxic to the least toxic: C218 (clomipramine) > F2696 >>>>> F2695.

With regard to over- and under-expressed clones at a Factor of 2, F2695 did not induce any signatures, even at a concentration of 100 μ M.

The concentration effect on the occurrence of signatures was confirmed by the fact that the weak signatures with F2696 at 1 μ M, which were present in the preceding analysis with an Induction factor of 1.7, disappear.

From a qualitative standpoint, the impact of F2696 and of clomipramine on Cox1 and on cytochrome *b* was also confirmed (G05/G09/I01 positions).

F2695, the pharmacologically-active enantiomer of F2207, was without significant impact in this test, whereas clomipramine is used as positive-control reference product.

Conversely, F2696, the pharmacologically-inactive enantiomer of F2207, showed a profile of signatures that is quantitatively and qualitatively close to that of clomipramine, and shows no signatures in common with F2695.

All of this is evidence of a superior toxico-genomic profile for the active F2695 enantiomer which, in this experimental model, had a very significantly better safety coefficient than that of F2696.

4.4 CONCLUSION

5 The genomic pharmacotoxicology studies performed on the F2695 and F2696 molecules, enantiomers of F2207 (at concentrations of 10, 50 and 100 μ M), and on C218 (clomipramine, at concentrations of 1, 10 and 50 μ M), using rat hepatocytes in primary culture, yielded concentration-dependent stress signatures and Toxicity Indices. These studies confirm the capacity of the genomic pharmacotoxicology test to reveal
10 stress signatures under treatment conditions (concentrations, duration of treatment) that do not cause any toxicity in a classic cell-viability assay such as the MTT assay.

 This study brings to light several important facts:

- in the primary rat hepatocyte model, only F2695, the pharmacologically-active enantiomer of F2207, did not induce a significant Toxicity Index;
- 15 • F2696, the inactive enantiomer of F2207, and clomipramine, the reference psychotropic product, induced marked Indices involving very similar or common stress signatures. In this system, clomipramine, the positive-control reference molecule, induced the highest number of stress signatures, significant indices having been observed starting at the lowest concentrations. On this subject, it is interesting to note
20 that clomipramine can induce a certain number of adverse events in man, such as tachycardia, orthostatic hypotension, cardiac conduction or rhythm disturbances, and exceptionally hepatitis. In cases of accidental overdosage with clomipramine, syncope, hematological disturbances and severe cardiovascular manifestations can be observed.

 Without inferring a common physiopathological mechanism, it is interesting to
25 note that F2696 showed very similar or common stress signatures to those of clomipramine and also induces adverse events such as the cardiovascular disturbances previously described.

 Thus, it is legitimate to suggest that the signatures observed are independent of
any antidepressant, or more broadly psychotropic, profile. On the contrary, the
30 signatures should indeed be considered to be “signatures of stress” (F2696 causes in particular reduced expression of a gene involved in protein synthesis and of a translation

initiation factor). All of this is evidence of a superior toxico-genomic profile for the active F2695 enantiomer which, in this experimental model, had a very significantly better safety coefficient than that of F2696.

CLAIMS

1. Use of a mixture of enantiomers of milnacipran (Z(\pm)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide) and/or of at least one of its metabolites, as well as their pharmaceutically-acceptable salts, such mixture
5 being enriched in the (1S,2R) enantiomer for the preparation of a drug intended for the treatment or the prevention of conditions or disorders by double inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake while limiting the risk of cardiovascular disturbances.
2. Use according to claim 1, characterized in that cardiovascular disturbances
10 correspond to an increase in blood pressure and/or an increase in heart rate.
3. Use according to claim 2, characterized in that the increase in blood pressure corresponds to an increase in diastolic blood pressure.
4. Use according to any one of claims 1 to 3, which also limits the risks of organ and/or tissue toxicity.
- 15 5. Use according to claim 4, characterized in that the organ toxicity is cardiac toxicity and the tissue toxicity is hepatic and/or renal toxicity.
6. Use according to any one of claims 1 to 5, characterized in that the (1S,2R) enantiomer of milnacipran is the hydrochloride of Z-(1S,2R)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide (F2695).
- 20 7. Use according to any one of claims 1 to 6, characterized in that the metabolite is selected from:
 - the hydrochloride of Z-phenyl-1-aminomethyl-2-cyclopropanecarboxylic acid (F1567),
 - phenyl-3 methylene-3-4-pyrrolidone-3 (F1612),
 - 25 ○ the hydrochloride of Z-(para-hydroxyphenyl)-1-diethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2782),
 - the oxalic acid of Z-phenyl-1-ethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2800), and
 - the hydrochloride of Z-phenyl-1-aminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2941).
- 30

8. Use according to claim 7, characterized in that the metabolite is the hydrochloride of Z-(para-hydroxyphenyl)-1-diethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2782).
9. Use according to any one of claims 1 to 8, characterized in that the mass/mass ratio between the (1S,2R) enantiomer and the (1R,2S) enantiomer in the mixture is greater than 95:5 ((1S,2R):(1R,2S)), preferably greater than 99:1 ((1S,2R):(1R,2S)), even more preferably greater than 99.5:0.5 ((1S,2R):(1R,2S)).
10. Use according to any one of claims 1 to 9, characterized in that the mixture of enantiomers is substantially pure in the hydrochloride of Z-(1S,2R)-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide (F2695).
11. Use according to any one of claims 1 to 9, characterized in that the mixture of enantiomers is substantially pure in the hydrochloride of Z-(para-hydroxyphenyl)-1-diethylaminocarbonyl-1-aminomethyl-2-cyclopropane (F2782).
12. Use according to any one of claims 1 to 11, characterized in that the drug is intended to treat or to prevent a disorder or condition selected from depression, in particular deep depression, resistant depression, depression in the elderly, psychotic depression, depression induced by treatment with interferon, depressive state, manic-depressive syndrome, seasonal depressive episodes, depressive episodes related to general health status, depressive episodes related to mood-altering substances, bipolar disease, schizophrenia, generalized anxiety, morose and marasmic states, stress-related diseases, panic attacks, phobias, in particular agoraphobia, obsessive-compulsive disorders, behavioral disorders, oppositional disorders, post-traumatic stress disorder, depression of the immune system, fatigue and accompanying pain syndromes, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and other functional somatic disorders, autism, disorders characterized by attention deficit due to general health status, attention disorders due to hyperactivity, eating disorders, neurotic bulimia, neurotic anorexia, obesity, psychotic disorders, apathy, migraine, pain and in particular chronic pain, irritable bowel syndrome, cardiovascular diseases and in particular

anxiety-depressive syndrome in myocardial infarctus or in hypertension, neurodegenerative diseases and related anxiety-depressive syndromes (Alzheimer's disease, Huntington's chorea, Parkinson's disease), urinary incontinence, in particular urinary incontinence related to stress and enuresis, drug addition and in particular anxiety-addiction to tobacco, in particular to nicotine, to alcohol, to narcotics, to drugs, to analgesics used in weaning-off from these addictive states.

- 5 13. Use according to claim 12, characterized in that the disorder is selected from depression, in particular deep depression, resistant depression, depression in the
10 elderly, psychotic depression, depression induced by treatments with interferon, depressive state, manic-depressive syndrome, seasonal depressive episodes, depressive episodes related to general healthy status, depression related to mood-altering substances.
14. Use according to claim 12, characterized in that the disorder is selected from
15 fatigue and the associated pain syndromes, chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and other functional somatic disorders.
15. Use according to claim 12, characterized in that the disorder is selected from urinary incontinence, in particular urinary incontinence related to stress and enuresis.
- 20 16. Use according to claim 12, characterized in that the condition is selected from drug addiction, including anxiety-addiction to tobacco, nicotine, alcohol, narcotics, drugs, and/or analgesics used in weaning-off from these addictive states.
17. Use according to any one of claims 1 to 16, by patient selected children, the
25 elderly, patients with hepatic and/or renal insufficiency, patients receiving treatment that induces hepatic or renal organ and/or tissue toxicity, patients receiving treatment for a heart condition, patients receiving treatment that induces cardiovascular side-effects, patients having a history of cardiovascular disease and/or suffering from cardiovascular disorders.
- 30 18. Use according to claim 17, characterized in that the history of cardiovascular disease and/or cardiovascular disorders is chosen among myocardial infarctus,

cardiac rhythm disorders (tachycardia, bradycardia, palpitations), blood pressure disorders (hypo- or hypertensive patients) and heart disease.

19. Use according to any one of claims 1 to 18, characterized in that the drug comprises:

5 a) the mixture of enantiomers enriched in the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and

b) at least one active compound selected from the psychotropics, in particular antidepressants, and antimuscarinic agents,

10 as associated products for use simultaneously, separately or staggered in time for the treatment or the prevention of depression, in particular deep depression, resistant depression, depression in the elderly, psychotic depression, depression induced by treatment with interferon, depressive state, manic-depressive syndrome, seasonal depressive episodes, depressive episodes related to general health status, depressive episodes related to mood-altering substances.

- 15 20. Use according to any one of claims 1 to 18, characterized in that wherein the drug comprises:

a) the mixture of enantiomers enriched in the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and

20 b) at least one other active substance selected among the active compounds that induce organ toxicity and the active compounds that induce cell toxicity, in particular hepatic and/or renal,

as associated products for use simultaneously, separately or staggered in time for the treatment or the prevention of conditions or disorders that can be managed by double inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake.

- 25 21. Use according to any one of claims 1 to 18, characterized in that the drug comprises:

30 a) the mixture of enantiomers enriched in the (1S,2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites as well as their pharmaceutically-acceptable salts, and

b) at least one other active substance selected among the active compounds that induce cardiovascular side effects,

as associated products for use simultaneously, separately or staggered in time for the treatment or the prevention of conditions or disorders that can be managed by double
5 inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake.

ABSTRACT

5 A method for treating or preventing a disorder or a condition by double inhibition of serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) reuptake in a subject in need thereof, while limiting the risks of cardiovascular disturbances and/or organ and/or tissue toxicity, comprising the step of administering to said subject a mixture of enantiomers of milnacipran enriched in the (1S, 2R) enantiomer of milnacipran and/or of at least one of its metabolites, as well as their pharmaceutically-acceptable salts.

1/4

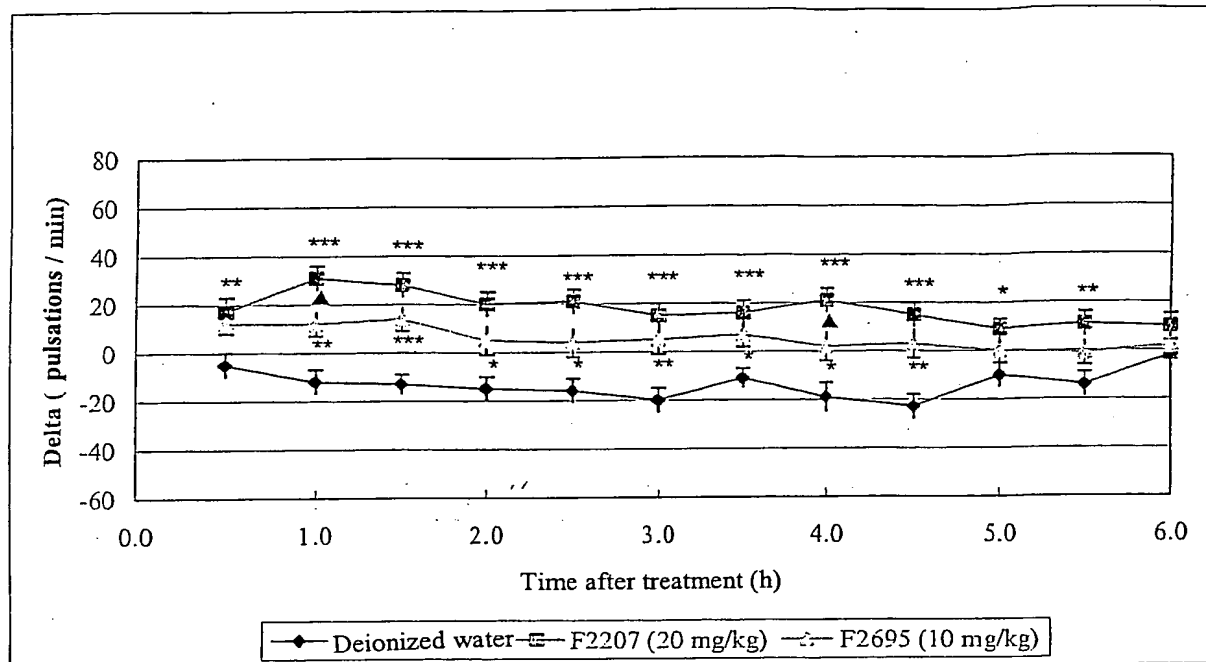


FIGURE 1

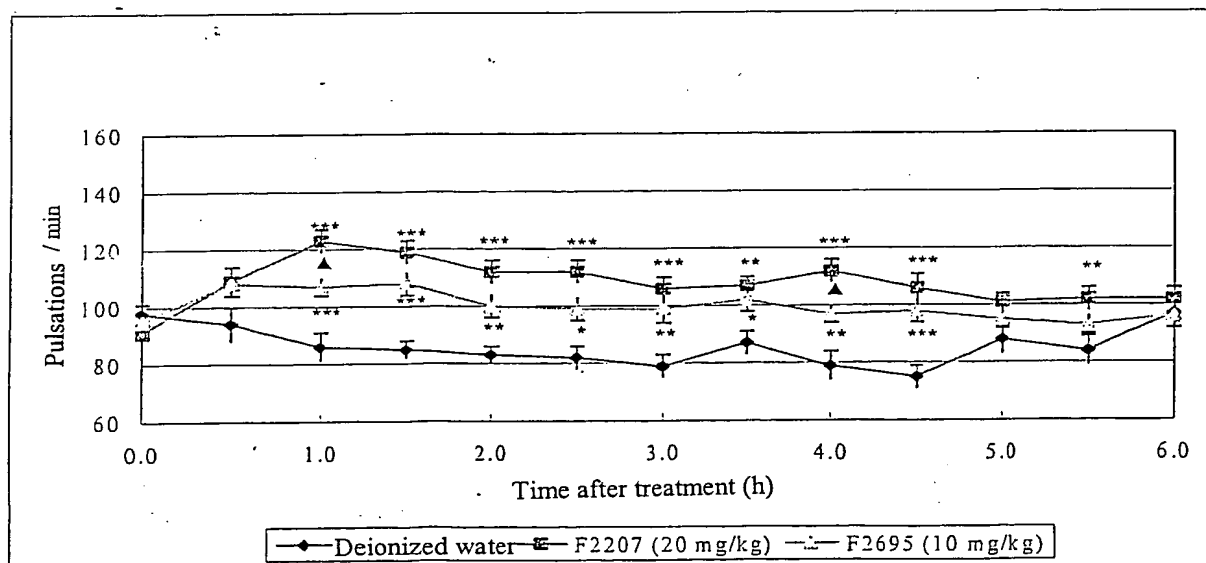


FIGURE 2

2/4

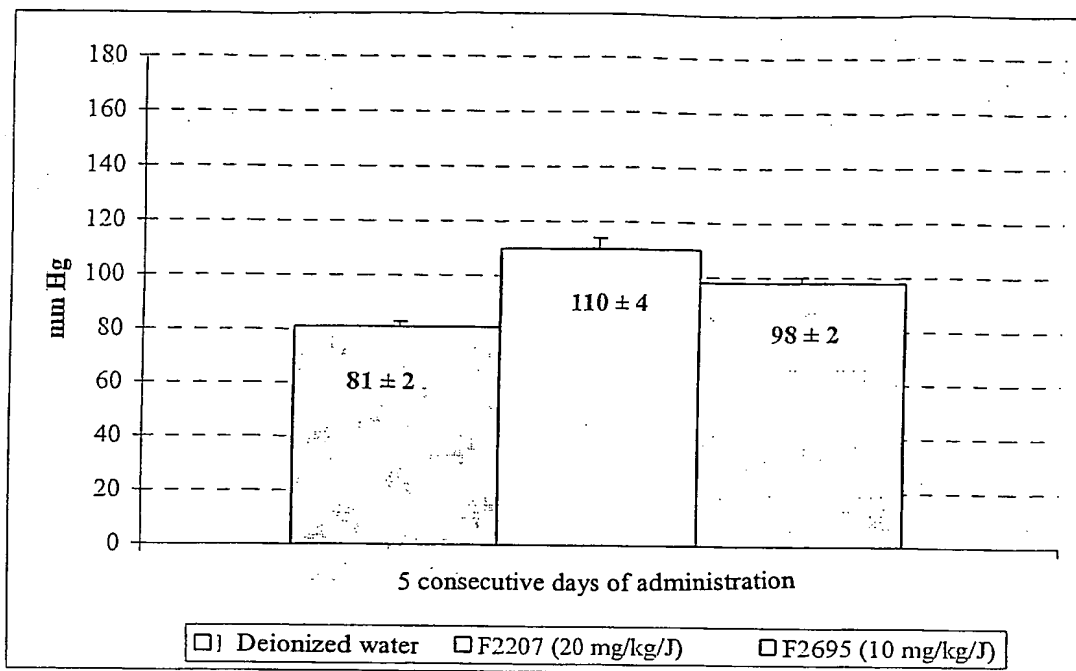


FIGURE 3

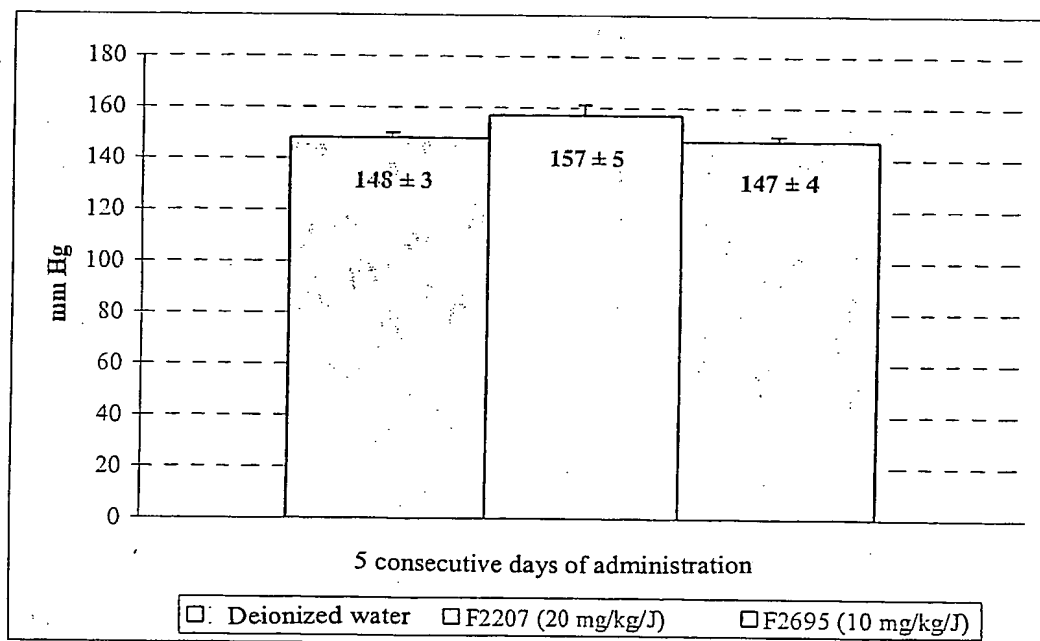


FIGURE 4

3/4

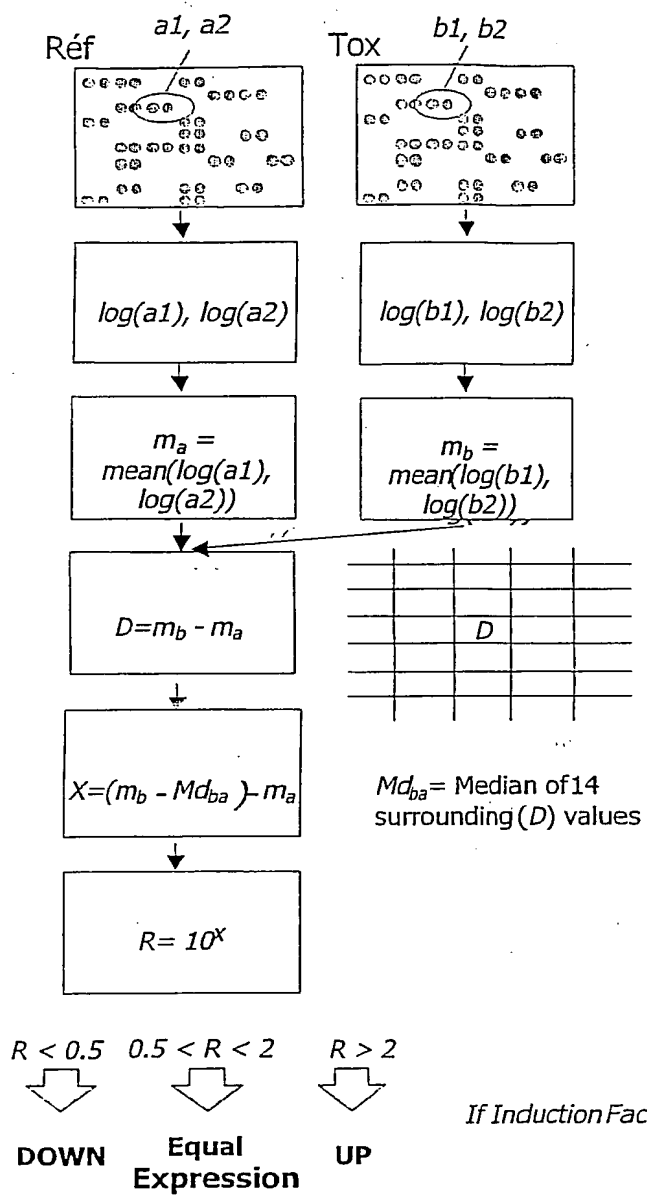
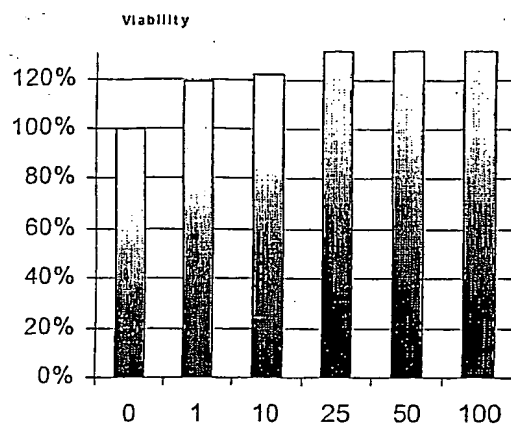


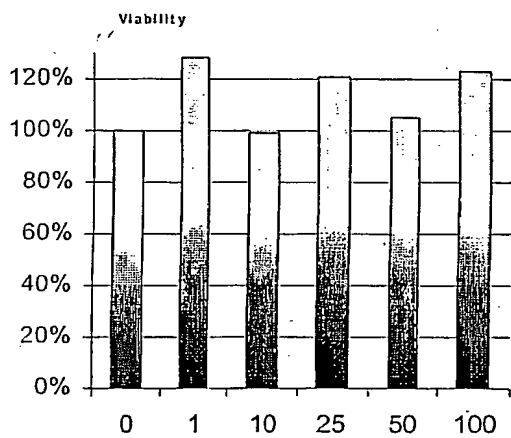
FIGURE 5

4/4



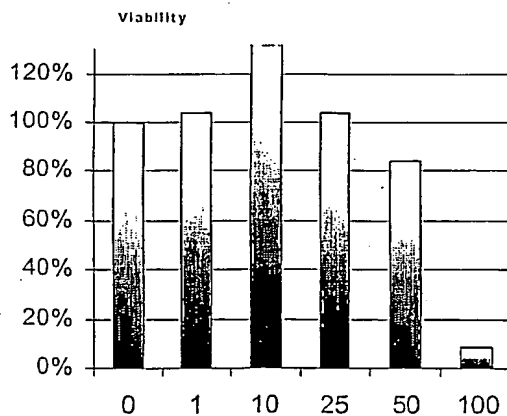
F2695

FIGURE 6A



F2696

FIGURE 6B



C218

FIGURE 6C



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 septembre 2004 (10.09.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/075886 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/135, 31/165

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000347

(22) Date de dépôt international :
16 février 2004 (16.02.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/01849 14 février 2003 (14.02.2003) FR
10/453,574 3 juin 2003 (03.06.2003) US

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place
Abel-Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **DEREG-
NAUCOURT, Jean** [FR/FR]; 11, boulevard Edgar Quinet,
F-75014 Paris (FR). **GROSSE, Richard** [FR/FR]; 319, rue
du Bourg, F-45520 Gidy (FR).

(74) Mandataires : **MARTIN, Jean-Jacques** etc.; Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17
(FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF THE ENANTIOMER (1S, 2R) OF MILNACIPRAN FOR THE PREPARATION OF A MEDICAMENT

(54) Titre : UTILISATION DE L'ENANTIOMERE (1S, 2R) DU MILNACIPRAN POUR LA PREPARATION D'UN MEDICA-
MENT

(57) Abstract: The invention relates to the use of an enantiomer mixture which is enriched in the enantiomer (1S, 2R) of Mil-
nacipran and/or at least one of the metabolites thereof, as well as the pharmaceutically-acceptable salts of same, for the preparation
of a medicament which is intended to prevent or treat pathologies that can be cured through the dual inhibition of the recapture of
serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA), while limiting the risks of cardiovascular disorders and/or tissue and/or organic toxicity.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'un mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du Mil-
nacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, pour la préparation d'un
médicament destiné à prévenir ou traiter des pathologies pouvant être soignées par l'inhibition double de la recapture de la séroto-
nine (5-HT) et de la noradrénaline (NA), tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou de toxicité organique et/ou
tissulaire.

WO 2004/075886 A1

**Utilisation de l'énantiomère (1S,2R) du milnacipran
pour la préparation d'un médicament**

La présente invention concerne l'utilisation d'un mélange d'énantiomères enrichi
5 en énantiomère de configuration spatiale (1S,2R) du Milnacipran et/ou d'au moins un de
ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, pour la
préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter des pathologies pouvant être
soignées par l'inhibition double de la recapture de la sérotonine (5-HT) et de la
noradrénaline (NA), tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou de
10 toxicité organique et/ou tissulaire. Plus particulièrement, le mélange d'énantiomères
selon l'invention est destiné à traiter la dépression, les syndromes de fatigue chronique
et l'incontinence urinaire.

Le Milnacipran (Z (±)-2-(amino méthyl)-N,N-diéthyl-1-phényl cyclopropane
15 carboxamide), molécule synthétisée au Centre de Recherche PIERRE FABRE
MEDICAMENT (Castres, France), également appelé TN-912, Dalcipran, Minalcipran,
Midalcipran ou Midalipran est connu comme inhibiteur double de la recapture de la
sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA). Le Milnacipran et son procédé de
préparation sont décrits dans le brevet US n° 4,478,836. D'autres informations relatives
20 au Milnacipran peuvent être trouvées dans la douzième édition de l'index Merck, sous
l'entrée n° 6 281.

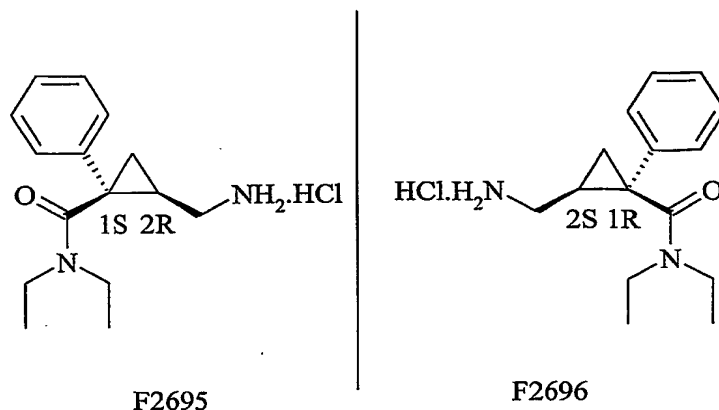
Les inhibiteurs doubles de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline
correspondent à une classe bien connue d'agents antidépresseurs qui inhibent de
manière sélective la recapture à la fois de la sérotonine et de la noradrénaline. A titre
25 d'exemple, la venlafaxine et la duloxétine sont également des inhibiteurs doubles de la
sérotonine et de la noradrénaline. Des études ont montré que le ratio entre l'inhibition de
la recapture de la noradrénaline et l'inhibition de la sérotonine par le Milnacipran est
d'environ 2 : 1 (Moret *et al.*, 1985 *Neuropharmacology* 24(12) : 1211-1219 ; Palmier *et*
al., 1989, *Eur J Clin Pharmacol* 37 : 235-238).

30 Le brevet US 4,478,836 décrit l'utilisation du Milnacipran pour le traitement de
pathologies du système nerveux central, notamment de la dépression. La demande de

brevet WO01/26623 décrit l'utilisation du Milnacipran en association avec de la phénylalanine et de la tyrosine dans des indications telles le traitement de la fatigue, des syndromes associés à la douleur, du syndrome de fatigue chronique, de la fibromyalgie, du syndrome de l'intestin irritable. La demande de brevet WO01/62236 décrit une composition comprenant du Milnacipran en association avec un ou plusieurs agents anti-muscariniques dans un grand nombre d'indications dont la dépression. La demande WO97/35574 décrit une composition pharmaceutique contenant du Milnacipran et de l'idazoxan comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps pour traiter la dépression et ses différentes formes, ainsi que les pathologies dans lesquelles les antidépresseurs sont utilisés. Le Milnacipran est également utilisé dans une indication de traitement de l'incontinence urinaire (FR 2 759 290).

La molécule de Milnacipran possède deux carbones asymétriques conduisant à deux configurations spatiales différentes (1S,2R) et (1R,2S). Ces configurations spatiales étant non superposables, la molécule de Milnacipran présente donc une isomérisation optique.

Le chlorhydrate de Milnacipran existe ainsi sous la forme de deux énantiomères optiquement actifs : l'énantiomère dextrogyre ou encore chlorhydrate de Z-(1S,2R)-2-(amino méthyl)-N,N-diéthyl-1-phényl cyclopropane carboxamide et l'énantiomère lévogyre chlorhydrate de Z-(1R, 2S)-2-(amino méthyl)-N, N-diéthyl-1 -phényl cyclopropane carboxamide. Le Milnacipran sous sa forme chlorhydrate (encore appelée F2207) est actuellement commercialisé (IXEL, PIERRE FABRE MEDICAMENT, France) sous forme de mélange racémique en tant que médicament antidépresseur sérotoninergique-noradrénergique. F2695 et F2696 désignent respectivement les énantiomères (1S,2R) (dextrogyre) et (1R,2S) (lévogyre) du chlorhydrate de Milnacipran (F2207) :



Ces deux énantiomères peuvent être séparés et isolés selon des procédés décrits dans la littérature (Bonnaud *et al.*, 1985, *Journal of Chromatography*, Vol. 318 : 398-403 ; Shuto *et al.*, *Tetrahedron letters*, 1996 Vol. 37 :641-644 ; Grard *et al.*, 2000, *Electrophoresis* 2000 21 : 3028-3034; Doyle et Hu, 2001, *Advanced Synthesis and Catalysis*, Vol. 343 : 299-302).

Les inventeurs ont maintenant réalisé une étude pharmacocinétique chez l'homme du racémate et des deux énantiomères du Milnacipran qui met en œuvre des méthodes de dosage d'énantio-sélectivité. Ils ont ainsi démontré l'absence de racémisation des énantiomères *in vivo*.

Par ailleurs, bien que le racémate ait été résolu, aucune analyse des propriétés pharmacologiques et toxicologiques des deux énantiomères n'a été réalisée, qui utilise les méthodes modernes actuellement à disposition telles les mesures cardiovasculaires par télémetrie, ou les analyses de prédictivité pharmaco-toxico-génomique *in vitro*.

Les antidépresseurs, comme tout principe actif, peuvent générer des effets indésirables ou certaines toxicités qui découlent pour l'essentiel des propriétés pharmacologiques de ces médicaments, mais également de la posologie, de la variabilité individuelle du patient (polymorphisme génétique, insuffisance organique, sexe, âge) ou d'interactions médicamenteuses. Ainsi les antidépresseurs représentent la troisième classe de produits responsables d'intoxication, après les hypnotiques et les tranquillisants (Nores *et al.*, 1987 *Thérapie* 42 : 555-558). Le risque de surdosage avec des antidépresseurs est grave puisqu'il peut conduire à la mort. Parmi les causes d'intoxications aiguës par les antidépresseurs, il convient de citer l'ingestion

involontaire par les enfants (d'autant que certains antidépresseurs sont utilisés pour le traitement de l'énurésie), la tentative de suicide, le surdosage involontaire par le médecin, la co-médication associée chez la personne âgée, les modifications physiologiques et pharmacocinétiques liés à l'âge (insuffisance cardiaque, insuffisance hépatique et/ou rénale ...), un métabolisme ralenti d'origine génétique ou médicamenteuse (inhibition enzymatique). Après les enfants, la personne âgée constitue donc la seconde population à risque parmi les patients traités. Ces personnes ont des concentrations plasmatiques plus élevées, liées à une clairance rénale et/ou hépatique amoindrie, et les risques d'intoxication y sont plus graves (Meadoer-Woodruff *et al.*, 1988 *J. Clin. Psychopharmacol.* 8 : 28-32).

Les effets secondaires indésirables, généralement bénins, observés durant le traitement par le Milnacipran sont surtout notés durant la première voire les deux premières semaines du traitement et s'estompent par la suite, parallèlement à l'amélioration de l'épisode dépressif. Les événements indésirables les plus communément rapportés en mono-thérapie ou lors d'association avec d'autres psychotropes sont des vertiges, une hyper-sudation, l'anxiété, des bouffées de chaleur, et de la dysurie. Certains effets indésirables moins communément rapportés sont des nausées, des vomissements, une sécheresse buccale, une constipation, des tremblements, des palpitations, une agitation, des éruptions cutanées. Il est par ailleurs connu que chez les patients présentant des antécédents cardiovasculaires ou recevant simultanément un traitement à visée cardiaque, l'incidence des effets indésirables de nature cardiovasculaire (hypertension, hypotension, hypotension orthostatique, palpitations) peut être augmentée par le Milnacipran. Chez les patients hypertendus ou atteints de cardiopathies, il est ainsi recommandé de renforcer la surveillance clinique car le Milnacipran sous forme de mélange racémique est susceptible d'augmenter la fréquence cardiaque. Ainsi, lors de rares cas de surdosage observés avec le Milnacipran (aux doses de 800 mg à 1 g) en mono-thérapie, les principaux symptômes observés sont les vomissements, les troubles respiratoires et une tachycardie (Dictionnaire Vidal, 78^{ème} édition, 2002). Un autre effet indésirable exceptionnellement induit par le Milnacipran est une élévation élevée des transaminases pouvant traduire une certaine toxicité hépatique.

De fait, les populations à risque susceptibles de développer un certain nombre de manifestations cliniques indésirables au cours ou à la suite d'un traitement par le Milnacipran, sont les enfants, les personnes âgées, les insuffisants hépatiques et/ou rénaux, les patients recevant un traitement induisant des toxicités organiques et/ou tissulaires, notamment des toxicités hépatiques et/ou rénales, les patients recevant un traitement à visée cardiaque ou induisant des effets secondaires cardiovasculaires, les patients présentant des antécédents cardiovasculaires et/ou atteints de troubles cardiovasculaires, notamment les patients présentant des troubles du rythme cardiaque, de la pression artérielle (patients hypo- ou hypertendus) ou les patients atteints de cardiopathies.

Dans un souci de prévenir, toujours plus avant, la survenue d'éventuels effets secondaires susceptibles de constituer un risque, aussi minime soit-il, pour la santé des patients traités au Milnacipran, les inventeurs ont maintenant découvert de manière surprenante et inattendue que l'énantiomère (1S,2R) du Milnacipran, qui présente l'essentiel de l'activité d'inhibition sélective de la re-capture de la sérotonine et de la noradrénaline, induit moins d'effets secondaires de nature cardiovasculaire et de toxicité organique et/ou tissulaire, notamment hépatique, que le mélange racémique. En particulier, les inventeurs ont découvert que l'administration chez le chien de l'énantiomère (1S,2R) du Milnacipran provoque une augmentation moindre de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle, en particulier de la pression artérielle diastolique, que celle susceptible d'être provoquée par l'administration du mélange racémique. Les inventeurs ont en outre découvert que l'énantiomère (1S,2R) du chlorhydrate de Milnacipran (F2695) présente un meilleur profil toxico-génomique que l'énantiomère (1R,2S) du chlorhydrate de Milnacipran (F2696) sur un modèle expérimental d'hépatocytes primaires de rat. Les inventeurs ont en outre démontré que l'énantiomère (1R,2S) (F2696) présente un profil toxico-génomique semblable à celui obtenu avec la Clomipramine, utilisée comme psychotrope de référence connue pour sa relative hépato-toxicité.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères du Milnacipran enrichi en énantiomère (1S,2R), de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement

acceptables, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter des pathologies ou affections pouvant être soignées par l'inhibition double de la recapture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA), tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant les risques de toxicité organique et/ou
5 tissulaire.

On entend par «troubles cardiovasculaires», des effets secondaires cardiovasculaires indésirables du médicament administré en mono-thérapie ou en association avec d'autres principes actifs.

Au sens de la présente invention, on entend par «effet secondaire», l'activité
10 prévisible d'un médicament dans un domaine autre que celui pour lequel il est administré, qui peut être gênante ou indésirable lorsqu'elle limite l'utilisation du médicament.

On entend par «toxicité», la propriété d'un médicament d'entraîner des effets nocifs au niveau organique et/ou tissulaire, notamment au niveau des organes ou tissus
15 impliqués dans le métabolisme du Milnacipran, notamment le métabolisme hépatique et/ou rénal du Milnacipran, et plus particulièrement lors du premier passage du Milnacipran au niveau hépatique. De préférence, la toxicité organique est la toxicité cardiaque et la dite toxicité tissulaire est la toxicité hépatique et/ou rénale.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par «tout en limitant les
20 risques de troubles cardiovasculaires» ou «tout en limitant les risques de toxicité» le fait d'empêcher que ces risques n'augmentent significativement chez un patient suite à l'administration du médicament.

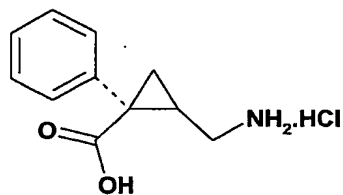
Dans le cadre de la présente invention, «énantiomère (1S,2R) du Milnacipran» désigne l'énantiomère (1S,2R) du Milnacipran, ainsi que les sels pharmaceutiquement
25 acceptables de celui-ci. De préférence, il s'agit de l'énantiomère (1S,2R) du chlorhydrate de Milnacipran (F2695). «Enantiomère (1R,2S) du Milnacipran» désigne l'énantiomère (1R,2S) du Milnacipran, ainsi que les sels pharmaceutiquement acceptables de celui-ci tels que le chlorhydrate (F2696). «Mélange racémique» désigne un mélange 50:50 en poids d'énantiomère (1S,2R) du Milnacipran et d'énantiomère
30 (1R,2S) du Milnacipran, ainsi que les sels pharmaceutiquement acceptables de ceux-ci.

Dans le cadre de la présente invention, «mélange d'énantiomères du Milnacipran enrichi en énantiomère (1S,2R)» signifie un mélange d'énantiomères (1S,2R) et d'énantiomère (1R,2S) du Milnacipran, dans lequel le ratio massique entre l'énantiomère (1S,2R) et l'énantiomère (1R,2S) est supérieur à 1:1. Dans le mélange d'énantiomères du Milnacipran enrichi en énantiomère (1S,2R), le ratio massique entre l'énantiomère (1S,2R) et l'énantiomère (1R,2S) est avantageusement supérieur ou égal à 55:45, plus avantageusement supérieur à 60:40, encore plus avantageusement supérieur à 65:35, encore plus avantageusement supérieur à 70:30, encore plus avantageusement supérieur à 75:25, encore plus avantageusement supérieur à 80:20. Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, le ratio massique entre l'énantiomère (1S,2R) et l'énantiomère (1R,2S) est supérieur à 82:18, de manière plus avantageuse supérieur à 84:16, de manière encore plus avantageuse supérieur à 86:14, de manière encore plus avantageuse supérieur à 88:12, de manière encore plus avantageuse supérieur à 90:10. Dans un mode de réalisation préféré, le ratio massique entre l'énantiomère (1S,2R) et l'énantiomère (1R,2S) est supérieur à 91:9, de manière plus préférée supérieur à 92:8, de manière encore plus préférée supérieur à 93:7, de manière encore plus préférée supérieur à 94:6, de manière encore plus préférée supérieur à 95:5, de manière encore plus préférée supérieur à 96:4, de manière encore plus préférée supérieur à 97:3, de manière encore plus préférée supérieur à 98:2, de manière encore plus préférée supérieur à 99:1, de manière encore plus préférée supérieur à 99,5:0,5. De manière particulièrement préférée, le mélange d'énantiomères du Milnacipran enrichi en énantiomère (1S,2R) est substantiellement pur, c'est-à-dire contenant environ 100% en poids d'énantiomère (1S,2R).

Il entre également dans le cadre de la présente invention d'utiliser les métabolites, de préférence les métabolites actifs *in vivo* du Milnacipran, et leurs sels pharmaceutiquement acceptables, tels que :

- le chlorhydrate de l'acide Z-(±)phényl-1 aminométhyl-2 cyclopropane carboxylique (F1567) :

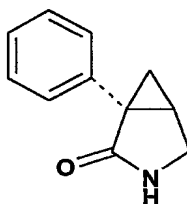
8



F1567

	Masse moléculaire :	277,7
5	Caractéristiques :	cristaux blancs
	Point de fusion :	230 °C
	Chromatographie sur plaque :	support : silice
		Solvant : Butanol/Ethanol/eau (6/2/2)
		Révélation : Ultra-violet et ninhydrine
10		Rf : 0,6

○ 1e (±)phényl-3 méthylène-3-4 pyrrolidone-3 (F1612) :

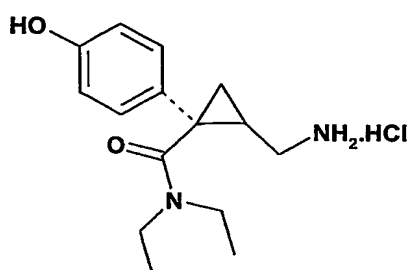


F1612

15

	Masse moléculaire :	173,2
	Caractéristiques :	cristaux blancs
	Point de fusion :	70 °C
20	Chromatographie sur plaque :	support : silice
		Solvant : Benzène/dioxane/éthanol (90/25/4)
		Révélation : Ultra-violet et iode
		Rf : 0,46

- le chlorhydrate de Z(±)-(para-hydroxyphényl)-1 diéthylaminocarbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2782) :



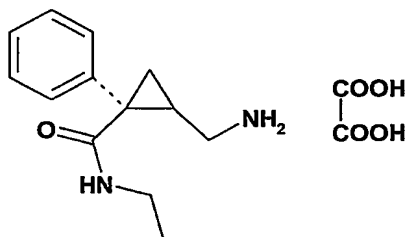
F2782

5

Masse moléculaire :	298,82
Caractéristiques :	cristaux blancs
Point de fusion :	250 °C
10 Chromatographie sur plaque :	support : silice
	Solvant : Butanol/Ethanol/eau (6/2/2)
	Révélation : Ultra-violet et iode - ninhydrine
	Rf : 0,42

15

- l'oxalate acide de Z(±)-phényl-1-éthylamino carbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2800) :



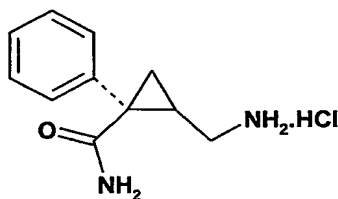
F2800

20

Masse moléculaire :	308,33
---------------------	--------

Caractéristiques : cristaux blancs
Point de fusion : 150 °C
Chromatographie sur plaque : support : silice
Solvant : CHCl₃/méthanol/NH₄OH (90/9/1)
Révélation : Ultra-violet et ninhydrine
Rf : 0,40

- le chlorhydrate de Z(±)-phényl-1 aminocarbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2941)



F2941

Masse moléculaire : 226,74
Caractéristiques : cristaux blancs
Point de fusion : 245 °C
Chromatographie sur plaque : support : silice
Solvant : CHCl₃/méthanol/NH₄OH (80/18/2)
Révélation : Ultra-violet et ninhydrine
Rf : 0,30

Tout comme le Milnacipran, ces métabolites présentent deux carbones asymétriques conduisant à deux configurations spatiales différentes (1S,2R) et (1R,2S). Ces configurations spatiales étant non superposables, ces métabolites présentent aussi une isomérisie optique. Le ratio des deux énantiomères du métabolite du Milnacipran dans le mélange d'énantiomères est tel que décrit précédemment pour les énantiomères du Milnacipran.

La présente invention couvre donc ces métabolites actifs, leurs énantiomères, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, ainsi que leur utilisation à titre de

médicament pour le traitement des pathologies décrites dans le présent brevet comme par exemple la dépression, la douleur, la fibromyalgie et l'incontinence urinaire. Les métabolites selon l'invention sont sous la forme de racémate ou de préférence sous la forme d'un mélange d'énantiomères enrichi en l'énantiomère (1S,2R) le plus actif. De
5 manière préférée, le métabolite actif utilisé provient de l'énantiomère F2695 et il s'agit de l'énantiomère (1S,2R) du métabolite actif. De manière plus préférée, il s'agit de l'énantiomère (1S,2R) du chlorhydrate de Z-(para-hydroxyphényl)-1 diéthylaminocarbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2782). Par métabolite actif, on entend désigner un dérivé provenant de la métabolisation du Milnacipran in vitro ou in
10 vivo et qui présente une aptitude à inhiber la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline ; de préférence, il s'agit du F2782, F2941, F2800, F1612 et F1567

La présente invention a donc également pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères de préférence enrichi en énantiomère (1S,2R) d'au moins un métabolite du Milnacipran, de préférence choisi parmi F2782, F2941, F2800, F1612, F1567, ainsi
15 que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter des pathologies ou affections pouvant être soignées par l'inhibition double de la recapture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA), tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité cardiaque, hépatique et/ou rénale.

Il entre également dans la portée de la présente invention d'utiliser un mélange
20 d'énantiomères du Milnacipran enrichi en énantiomère (1S,2R), de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, et d'au moins un de ses métabolites, de préférence choisi parmi F2782, F2941, F2800, F1612, F1567, enrichi de préférence en énantiomère (1S,2R), pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter
25 des pathologies ou affections pouvant être soignées par l'inhibition double de la recapture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA), tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité cardiaque, hépatique et rénale.

«Sel pharmaceutiquement acceptable» désigne tous les sels qui conservent
30 l'efficacité et les propriétés d'un principe actif et qui ne présentent pas d'effets secondaires. De préférence, il s'agit de sels d'acides minéraux ou organiques

pharmaceutiquement acceptables. A titre d'exemples préférés, mais non limitatifs, on mentionnera les halogénohydrates, tels que chlorhydrate et le bromhydrate, le fumarate, le maléate, l'oxalate, le citrate, le méthane sulfonate, le glutamate, le tartrate, le mésylate, et leurs hydrates éventuels.

5 Au sens de la présente invention, le terme « mélange d'énantiomères » signifie le mélange d'énantiomères du Milnacipran enrichi en énantiomère (1S,2R), ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et/ou le mélange d'énantiomères d'au moins un des métabolites du Milnacipran, de préférence enrichi en énantiomère (1S,2R) ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables.

10 Le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, sont administrés à tout type de patients nécessitant un tel traitement, que ce soit dans un but thérapeutique et/ou prophylactique. Dans un but thérapeutique, on vise l'éradication ou l'amélioration de l'affection à traiter et/ou d'un ou plusieurs symptôme(s) associé(s). Dans un but prophylactique, on vise la prévention
15 de l'apparition de l'affection à traiter et/ou d'un ou plusieurs symptôme(s) associé(s). Néanmoins, le mélange d'énantiomères selon l'invention est plus particulièrement adapté à des populations de patients à risque qui seraient susceptibles de développer certaines manifestations cliniques indésirables au cours ou à la suite d'un traitement par le Milnacipran sous forme racémique. Il s'agit notamment des enfants, des personnes
20 âgées, des insuffisants hépatiques et/ou rénaux, des patients recevant un traitement induisant des toxicités organiques et/ou tissulaires, hépatiques ou rénales, des patients recevant un traitement à visée cardiaque, des patients recevant un traitement induisant des effets secondaires cardiovasculaires, des patients présentant des antécédents cardiovasculaires (par exemple l'infarctus du myocarde) et/ou atteints de troubles
25 cardiovasculaires, tels des patients présentant des troubles du rythme cardiaque (tachycardie, bradycardie, palpitations), des patients présentant des troubles de la pression artérielle (patients hypo- ou hypertendus) ou des patients atteints de cardiopathies.

30 Parmi les multiples pathologies ou affections qui présentent comme symptôme des troubles du rythme cardiaque et pour lesquelles la présente invention est particulièrement adaptée au traitement des patients à risque qui en sont affectés, il

convient de citer plus particulièrement la tachycardie qui correspond à une accélération du rythme des battements cardiaques (la tachycardie est modérée lorsque les pulsations sont de 80 à 100 par minutes, intense quand elles dépassent 100), les palpitations, les extrasystoles (sporadiques, fréquentes ou au cours de l'infarctus du myocarde), la
5 fibrillation auriculaire, le flutter et la tachysystolie auriculaires, la bradycardie, l'insuffisance cardiaque, et l'infarctus du myocarde.

Parmi les multiples pathologies qui présentent comme symptôme des troubles de la pression artérielle et pour lesquelles la présente invention est particulièrement adaptée au traitement des patients à risque qui en sont affectés, il convient de citer plus
10 particulièrement : l'hypertension artérielle, l'hypertension artérielle maligne, l'hypertension artérielle pulmonaire, l'hypertension portale, l'hypertension paroxystique essentielle, l'hypotension, l'hypotension orthostatique, l'hypertension intra-crânienne.

Avantageusement, les troubles cardiovasculaires dont les risques peuvent être limités par l'administration du mélange d'énantiomères selon l'invention, et de
15 préférence par l'administration de l'énantiomère F2695 substantiellement pur, sont :

- l'élévation de la pression artérielle diastolique et/ou systolique mesurée en millimètres de mercure (mm de Hg) ; plus particulièrement, il s'agit de l'augmentation de la pression cardiaque diastolique, et/ou,
- 20 ➤ des troubles du rythme cardiaque, notamment une augmentation de la fréquence cardiaque chez le patient.

La pression artérielle systolique est la valeur maximale de la pression artérielle, et elle correspond au moment où on entend les premiers battements cardiaques au niveau de l'artère humérale lors de la mesure de la pression artérielle. La systole est la
25 période de la révolution cardiaque au cours de laquelle les cavités du cœur se contractent, entraînant ainsi l'éjection du sang. La pression artérielle diastolique est la valeur minimale de la pression artérielle, qui correspond à la disparition des bruits cardiaques au niveau de l'artère humérale lorsque l'on dégonfle le brassard tensionnel lors de la mesure de la pression artérielle. La diastole est la période de la révolution
30 cardiaque au cours de laquelle les cavités du cœur se remplissent de sang. L'élévation de la pression systolique et/ou diastolique implique l'élévation de la tension artérielle qui

caractérise l'hypertension artérielle systémique (et ses variantes) dont les symptômes peuvent être les suivants : maux de tête, fatigue, troubles sensoriels légers tels des vertiges, des bourdonnements d'oreilles, des palpitations, un saignement de nez, de la confusion ou de la somnolence, des crampes, engourdissements ou des fourmillements dans les pieds et les mains. L'hypertension artérielle systémique (et ses variantes) peut aboutir à des complications graves, voire parfois mortelles : accidents neurologiques d'origine vasculaire, insuffisance ventriculaire gauche, insuffisance rénale, cardiopathies ischémiques (infarctus du myocarde, angor et leurs variantes). Selon les recommandations actuelles, on considère qu'un patient est affecté d'hypertension artérielle lorsque la pression artérielle est supérieure à 90 mm d'Hg pour la pression diastolique et 140 mm d'Hg pour la pression systolique.

La toxicité dont les risques peuvent être limités par l'administration du mélange d'énantiomères selon l'invention est avantageusement la toxicité organique, notamment la toxicité cardiaque, et/ou la toxicité tissulaire, notamment la toxicité hépatique et/ou rénale. Cette toxicité tissulaire peut être révélée par la présence d'ictères ou par des marqueurs biologiques.

Il entre également dans la portée de la présente invention d'utiliser le mélange d'énantiomères selon l'invention en médecine vétérinaire pour le traitement d'animaux, notamment d'animaux domestiques ou d'élevage nécessitant un tel traitement.

De par leurs propriétés pharmacologiques, notamment d'inhibiteurs doubles de la re-capture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA), le mélange d'énantiomères est particulièrement utile à la préparation de médicaments destinés au traitement préventif et/ou curatif de nombreuses pathologies ou affections (syndrome) décrites ci-après tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité cardiaque hépatique et/ou rénale.

Parmi ces pathologies ou affections, il convient de citer les pathologies du système nerveux central telles que définies dans « *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders –IV (DSM-IV)*, 1995 American Psychiatric Association ». A titre d'exemples illustratifs et non limitatifs, il convient de citer, la dépression, notamment la dépression profonde, la dépression résistante, la dépression du sujet âgé,

la dépression psychotique, la dépression induite par des traitements interféron, l'état dépressif, le syndrome maniaco-dépressif, les épisodes dépressifs saisonniers, les épisodes dépressifs liés à une condition médicale générale, les épisodes dépressifs liés à des substances agissant sur l'humeur, le syndrome bipolaire, la schizophrénie, l'anxiété généralisée, les états de morosité et de marasme, les maladies liées au stress, les attaques de panique, la phobie, notamment l'agoraphobie, les troubles obsessionnels compulsifs, les troubles de la conduite, les troubles oppositionnels, les syndromes de stress post-traumatiques, la dépression du système immunitaire, la fatigue et les syndromes de douleur qui l'accompagnent, le syndrome de fatigue chronique, la fibromyalgie, et autres pathologies de nature somatique fonctionnelle, l'autisme, les pathologies caractérisées par une absence d'attention dues à des conditions médicales générales, les troubles de l'attention dus à de l'hyperactivité, les troubles des conduites alimentaires, la névrose boulimique, la névrose anorexique, l'obésité, les désordres psychotiques, l'apathie, la migraine, la douleur, et notamment la douleur chronique, le syndrome du colon irritable, les maladies cardio-vasculaires, et notamment le syndrome anxio-dépressif dans l'infarctus du myocarde ou dans l'hypertension, les maladies neuro-dégénératives et les syndromes anxio-dépressifs associés (maladie d'Alzheimer, Chorée de Huntington, maladie de Parkinson), les incontinences urinaires, notamment l'incontinence urinaire liée au stress et l'énurésie, la dépendance aux drogues, et notamment l'anxio-dépendance au tabac, notamment à la nicotine, à l'alcool, aux stupéfiants, aux drogues, aux antalgiques lors du sevrage de ces états de dépendance.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter la dépression ou l'état dépressif tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité hépatique et/ou rénale. Dans le cadre de la présente invention, on entend par « dépression » un ensemble de symptômes comprenant d'une part un aspect psychique constitué de troubles de l'humeur avec pessimisme, douleur morale, idées de mort et de suicide, inhibition psychique, et d'autre part un aspect physique d'inhibition motrice constitué notamment d'un ralentissement moteur, de troubles de l'appétit, de

constipation, de troubles du sommeil et de la régulation du poids. La dépression correspond donc à un état psychique pathologique associant une modification pénible de l'humeur et un ralentissement de l'activité intellectuelle et motrice. On entend par « état dépressif » un état mental caractérisé par un fléchissement du tonus neuropsychique, se manifestant par la lassitude, la fatigabilité, le découragement et la tendance au pessimisme et s'accompagnant quelquefois d'anxiété.

Egalement, la présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter la fibromyalgie et/ou le syndrome de fatigue chronique tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité hépatique et/ou rénale. Le syndrome de fibromyalgie est un syndrome chronique caractérisé par une sensation de douleur ou de brûlure avec enraidissement matinal touchant principalement les tissus fibreux articulaires et péri-articulaires, et par un sentiment de fatigue profonde. La fibromyalgie comporte un ensemble de symptômes. Les plus fréquents sont un sommeil non réparateur, des maux de tête, des troubles digestifs, un état dépressif, des spasmes musculaires, des douleurs au visage, des engourdissements, etc. Le syndrome de fatigue chronique est caractérisé par un état d'épuisement ou de fatigue. Les symptômes les plus courants sont un état de faiblesse, des spasmes et/ou des douleurs musculaires, un besoin de sommeil excessif, de la fièvre, une angine, des pertes de mémoire et/ou des problèmes de concentration, des insomnies, une dépression.

Egalement, la présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter douleur et notamment la douleur chronique tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité hépatique et/ou rénale. La douleur peut être associée à différentes pathologies et/ou blessures. Elle peut être aiguë ou chronique. Des études épidémiologiques ont démontré les relations existant entre des états de douleurs chroniques et les anxio-dépressions. Ainsi, des patients souffrant de douleur chronique peuvent développer des

problèmes émotionnels qui conduisent à une dépression, et, dans le pire des cas, à une tentative de suicide. On considère qu'un patient est atteint de douleurs chroniques s'il se plaint de souffrir depuis une période excédant six mois. Parmi les douleurs chroniques il convient de citer à titre d'exemple illustratif et non limitatif, les douleurs associées à la fibromyalgie et/ou provenant de tissus fibreux, des muscles, des tendons, des ligaments et autres sites, les douleurs abdominales et les diarrhées dans le syndrome du colon irritable, et également les douleurs du bas du dos.

Egalement, la présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'un mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter les incontinences urinaires, notamment l'incontinence urinaire liée au stress et l'énurésie, tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires et/ou tout en limitant la toxicité organique et/ou tissulaire, notamment la toxicité hépatique et/ou rénale.

Le traitement prophylactique et thérapeutique des pathologies ci-dessus est réalisé en délivrant à un animal, de préférence l'homme, une quantité thérapeutiquement efficace d'un mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, seul ou en association avec au moins un autre principe actif. Dans la plupart des cas, il s'agit de l'homme, mais le traitement est également adapté aux animaux, notamment aux animaux d'élevage (bétail, rongeurs, volailles, poissons,...) et aux animaux de compagnie (chiens, chats, lapins, chevaux,...).

Le mélange d'énantiomères, enrichi en énantiomère (1S,2R), du Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, tel que précédemment décrit, est avantageusement administré à des patients recevant simultanément, séparément ou de manière décalée dans le temps au moins un second composé actif dans le traitement des pathologies précédemment citées.

De manière préférée, la présente invention a également pour objet l'utilisation comme médicament:

- a) dudit mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et

b) d'au moins un composé actif choisi parmi les psychotropes, notamment les anti-dépresseurs, et les agent anti-muscariniques,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps pour le traitement ou la prévention de la dépression, notamment la
5 dépression profonde, la dépression résistante, la dépression du sujet âgé, la dépression psychotique, la dépression induite par des traitements interféron, l'état dépressif, le syndrome maniaco-dépressif, les épisodes dépressifs saisonniers, les épisodes dépressifs liés à une condition médicale générale, les épisodes dépressifs liés à des substances agissant sur l'humeur.

10 Par psychotrope, on entend désigner une substance d'origine naturelle ou artificielle capable de modifier l'activité mentale et dont l'action essentielle s'exerce sur le système nerveux central et le psychisme. Les psychotropes sont divisés en trois groupes : 1) les psycholeptiques (hypnotiques, neuroleptiques et anxiolytiques), 2) les psychoanaleptiques (antidépresseurs et psychotoniques) et 3) les psychodysleptiques
15 (hallucinogènes).

De préférence, ledit psychotrope est un antidépresseur. A titre d'exemple non limitatif, l'antidépresseur est choisi parmi (i) les inhibiteurs de la mono-amine-oxydase (IMAO) tels que l'iproniazide, la pargyline, la sélégine, (ii) les agonistes 5HT_{1D} tels que le sumatriptan, l'adrénaline et la noradrénaline (sympatho-mimétiques alpha et
20 bêta) (iii) les antidépresseurs tricycliques, tels l'imipramine, la clomipramine, (iv) les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (SSRI) tel la fluoxétine, (v) les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la norépinéphrine, tels par exemple la tandamine, le fluparoxan, la mirtazapine (vi) les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la norépinéphrine, tels la venlafaxine et la duloxétine. A titre d'exemple non limitatif,
25 l'agent anti-muscarinique est sélectionné parmi la toltérodine, la propivéline, l'oxybutynine, le trospium, la darifénacine, la témivérine, l'ipratropium.

De manière préférée, la présente invention a également pour objet l'utilisation comme médicament:

a) dudit mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du
30 Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et

- b) d'au moins un autre principe actif sélectionné parmi les composés actifs induisant une toxicité organique et les composés actifs induisant une toxicité tissulaire, notamment hépatique et/ou rénale ou avec un ou plusieurs principes actifs destinés au traitement de l'insuffisance hépatique et/ou rénale,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps pour le traitement ou la prévention des affections ou pathologies pouvant être soignées par l'inhibition double de la re-capture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA).

- De manière préférée, la présente invention a également pour objet l'utilisation comme médicament:

- a) dudit mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et
- b) d'au moins un autre principe actif sélectionné parmi les composés actifs induisant des effets secondaires cardiovasculaires et les composés à visée cardiaque,

comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps pour le traitement ou la prévention des affections ou pathologies pouvant être soignées par l'inhibition double de la re-capture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA).

Avantageusement, les effets secondaires cardiovasculaires induits sont ceux précédemment évoqués, et plus particulièrement une hypertension artérielle, une hypotension, des troubles du rythme cardiaque (tachycardie, bradycardie, palpitations).

- La présente invention a également pour objet les compositions pharmaceutiques contenant les produits de combinaison précédemment décrits.

Dans le cadre de la présente invention, le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, est avantageusement administré, de façon non limitative, par voie orale, voie nasale, transdermique, rectale, intestinale, parentérale, par injection intramusculaire, sous-

cutanée ou intraveineuse, seul ou en association avec d'autres principes actifs, comme précédemment décrit.

Quand ils sont administrés seuls, le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, peut être administré *per se* ou sous la forme d'une composition pharmaceutique dans laquelle le dit mélange d'énantiomères ou de leurs sels pharmaceutiquement acceptables, est en association ou en mélange avec un ou plusieurs supports, excipients et/ou diluants pharmaceutiquement acceptables, facilitant notamment la biodisponibilité.

Quand le mélange d'énantiomères selon l'invention, et de préférence l'énantiomère (1S,2R) F2695 du Milnacipran substantiellement pur, est administré en association avec d'autres principes actifs, ledit mélange et les autres principes actifs peuvent être formulés en mélange ou à part sous une forme identique ou différente. Ils peuvent être administrés par la même voie ou une voie différente.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être formulées de manières conventionnelles bien connues de l'homme de l'art en utilisant un ou plusieurs supports physiologiquement acceptables comprenant des excipients, adjuvants et des auxiliaires tels par exemple des agents conservateurs, des stabilisants, des agents de mouillage ou d'émulsification. La méthode de formulation choisie dépend de la voie d'administration désirée.

Dans le cas d'une administration par injection, on utilise avantageusement une solution aqueuse, notamment une solution tampon physiologiquement acceptable, telle qu'une solution de Hank, une solution de Ringer ou une solution tampon saline physiologique. Dans le cas d'une administration transdermique ou au niveau des muqueuses, on utilise avantageusement des agents pénétrants appropriés à la muqueuse à traverser. De tels agents pénétrants sont bien connus de l'homme du métier. Dans le cas d'une administration orale, les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont avantageusement administrées sous formes unitaires ou multidoses d'administration en mélange avec des supports pharmaceutiques adéquats connus de l'homme du métier. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent notamment les comprimés éventuellement sécables, les gélules, les poudres, les granulés et les

solutions ou suspensions orales, les aérosols. Les formes multidoses d'administration appropriées comprennent notamment les gouttes buvables, les émulsions et les sirops.

Lors de la préparation de comprimés, le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, est formulé avec
5 un véhicule pharmaceutiquement acceptable tel que notamment la polyvinylpyrrolidone, le gal carbopol, le polyéthylène glycol, la gélatine, le talc, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, la gomme arabique ou leurs analogues. A titre d'exemple, le comprimé contient les excipients suivants : hydrogénophosphate de calcium déshydraté, carmellose calcique, povidone K30, silice colloïdale anhydre, stéarate de magnésium,
10 talc. Les comprimés peuvent éventuellement être enrobés, c'est-à-dire recouverts de plusieurs couches de substances diverses telles que du saccharose, afin de faciliter la prise ou la conservation. L'enrobage peut aussi contenir des pigments ou des colorants afin de distinguer et de caractériser les comprimés en fonction de leur dosage, par exemple. Les comprimés peuvent encore présenter une formulation plus ou moins
15 complexe destinée à modifier la vitesse de libération du principe actif. La libération du principe actif dudit comprimé peut être accélérée, ralentie ou retardée en fonction de l'absorption désirée. Le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, peut être ainsi préparé sous une forme galénique à libération prolongée obtenue selon le procédé décrit dans le brevet EP 939
20 626. Cette forme galénique se présente sous forme multiparticulaire réunissant une pluralité de minigranules et présente un certain profil de libération *in vitro*.

La libération du mélange d'énantiomères selon l'invention peut être retardée et/ou contrôlée via l'utilisation d'un implant ou via une libération transcutanée, notamment sous-cutanée ou intramusculaire, via une injection intramusculaire ou via un
25 patch transdermique. Ledit mélange est alors formulé avec notamment des substances hydrophobes ou polymériques adéquates et des résines échangeuses d'ions.

La quantité à administrer au patient du mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, dépend des affections à traiter, de l'effet visé, notamment un effet thérapeutique ou prophylactique,
30 de l'état de santé et de l'âge du patient, notamment de ses antécédents cardiovasculaires, des conditions de traitement et du mode d'administration du médicament. Les quantités

efficaces thérapeutiques ou prophylactiques à administrer à un patient humain peuvent être déterminées à partir de modèles animaux ou des données, connues de l'homme du métier, lors du traitement de la dépression chez l'homme par exemple par l'utilisation d'un mélange racémique du Milnacipran.

5 Dans le cadre du traitement prophylactique et/ou thérapeutique des pathologies citées ci-dessus, et notamment de la dépression, des états dépressifs, de la fibromyalgie, du syndrome de fatigue chronique, de la douleur, le médicament selon l'invention est avantagement administré à des doses comprises entre 0,01 mg et 10 mg/kg de poids corporel par jour en une ou plusieurs prises, encore plus avantagement à des doses
10 comprises entre 0,05 mg et 5 mg / kg de poids corporel par jour en une ou plusieurs prises, encore plus avantagement à des doses comprises entre 0,1 mg et 1 mg / kg de poids corporel par jour en une ou plusieurs prises. D'une manière particulièrement avantageuse, l'administration dudit médicament à des doses telles que définies ci-dessus est répartie en deux prises quotidiennes, de préférence sous forme de gélule. A titre
15 d'exemple, le mélange d'énantiomères selon l'invention, de préférence l'énantiomère F2695 substantiellement pur, est administré sous la forme de gélule dont la teneur en principe actif est avantagement d'environ 6,75 mg/gélule, 12,5 mg/gélule, 25 mg/gélule, 50 mg/gélule.

20 D'autres caractéristiques, buts et avantages de l'invention ressortiront des exemples qui suivent. L'invention ne se trouve pas limitée aux exemples particuliers mentionnés à simple titre illustratif et qui doivent être lus en regard des figures suivantes :

Légende des Figures

25 Figure 1 : Evolution de la fréquence cardiaque après administration unique (valeurs de deltas).

*** $p \leq 0.001$ versus eau désionisée

** $p \leq 0.01$ versus eau désionisée

* $p \leq 0.05$ versus eau désionisée

30 ▲ $p \leq 0.05$ versus F2207

Figure 2 : Evolution de la fréquence cardiaque après administration unique (valeurs absolues).

*** $p \leq 0.001$ versus eau désionisée

** $p \leq 0.01$ versus eau désionisée

5 * $p \leq 0.05$ versus eau désionisée

▲ $p \leq 0.05$ versus F2207

Figure 3 : Effets des divers traitements sur les valeurs moyennes de pressions artérielles diastoliques (moyennes sur les 6 heures suivant le dernier traitement, après 5 jours de traitement consécutifs).

10

Figure 4 : Effets des divers traitements sur les valeurs moyennes de pressions artérielles systoliques (moyennes sur les 6 heures suivant le dernier traitement, après 5 jours de traitement consécutifs).

15

Figure 5 : Représentation schématique du mode de calcul de l'index de toxicité. L'index de toxicité est la somme de tous les gènes up et down-régulés (en fonction du facteur d'induction défini par l'utilisateur).

20 Figures 6a, 6b, 6c : Test au MTT sur des hépatocytes primaires de rats.
Les concentrations sont exprimées en μM .

EXEMPLES

25 EXEMPLE N°1 : Etudes pharmacocinétiques du Milnacipran et de ses énantiomères

Des études pharmacocinétiques du chlorhydrate de Milnacipran (F2207) et de ses énantiomères (F2695 et F2696) ont été réalisées dans différentes espèces animales et chez l'homme.

30 Chez l'animal, la pharmacocinétique de chaque énantiomère a été étudiée suite à l'administration du racémate ou d'un seul énantiomère. Les taux plasmatiques des

énantiomères F2695 et F2696 sont approximativement équivalents dans les espèces testées (singe et rat).

Une étude pharmacocinétique chez l'homme comprenant 12 sujets sains a été réalisée en leur administrant le racémate ou un seul des deux énantiomères. Il ressort
 5 que le profil pharmacocinétique de chaque énantiomère est indépendant du fait qu'ils aient été administrés soit séparément soit sous forme de racémate indiquant l'absence d'interactions entre les deux énantiomères (Tableau 1).

10 **Tableau 1 : Tableau des principales variables pharmacocinétiques du chlorhydrate de Milnacipran (F2207) et de ses deux énantiomères F2695 et F2696.**

C_{max} : Concentration plasmatique maximale estimée directement à partir des données expérimentales

T_{max} : Temps d'obtention de la concentration plasmatique maximale

15 AUC_{0→∞} : Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps extrapolé à l'infini

T_{1/2} : Demi-vie terminale de décroissance des concentrations plasmatiques

Dose administrée (mg)	F2207 (50 mg)		F2695 (D) (25 mg)	F2696 (L) (25 mg)
	F2695 (D)	F2696 (L)		
C_{max} (nmol.l⁻¹)	214	179	216	212
T_{max} (heure)	3,42	2,87	3,08	2,21
AUC 0→∞ (nmol.h.l⁻¹)	2896	1563	2869	1543
T ½ (heures)	9,28	5,75	9,38	5,58

20 Ces résultats indiquent qu'aucune bioconversion des énantiomères F2695 et F2696) n'a été détectée dans les espèces analysées.

EXEMPLE N°2 : Etudes biochimiques du Milnacipran et de ses énantiomères

Les deux énantiomères (F2695 et F2696) du chlorhydrate de milnacipran (F2207) ont été étudiés *in vitro* sur les captures de noradrénaline et sérotonine ainsi que sur la liaison (binding) de la paroxétine au niveau du cerveau du rat.

5

2. 1. MATERIELS ET METHODES**2.1.1. Capture de noradrénaline par un homogenat (P₂) d'hypothalamus de rat.****Préparation du P₂**

Des rats mâles, Sprague-Dawley, de 200 à 300 g sont assommés et décapités, puis l'hypothalamus prélevé rapidement. Deux hypothalami sont homogénéisés dans 4 ml de sucrose 0,32 M au Potter S par 16 allers et retours complets à 800 tours/min, puis centrifugés 10 mn à 1 000 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé 20 mn à 10 000 g et le P₂ ainsi obtenu repris dans 4 ml de sucrose 0,32 M et homogénéisé au Dounce.

Capture (« Uptake »)

On utilise de la ³H-(1)-NA : 13 Ci/mmmole (Amersham).

L'uptake se fait en tampon phosphate (contenant par litre : 8 g de NaCl, 1,21 g de K₂HPO₄ et 0,34 g de KH₂PO₄) préoxygéné 30 mn avant utilisation par un mélange O₂/CO₂ (95 % / 5 %).

Dans des tubes en plastique de 5 ml placés au bain marie à 37°C sont introduits :

- 100 µl de tampon ou inhibiteur,
- 700 µl de tampon (contenant de la pargyline 25 µM),
- 100 µl de P₂.

Après équilibration de la température, la réaction démarre par addition de 100 µl de ³H-NA, 50 nM en final.

10 mn exactement après, la réaction est stoppée par addition de 2,5 ml de tampon glacé et filtration sur filtres GF/F. Puis le tube est rincé une fois et le filtre une fois avec 2,5 ml de tampon glacé. Le filtre est ensuite introduit dans une mini-fiole Beckman et après addition de 3 ml de liquide scintillant Instagel (Packard), la radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation liquide Tricarb Packard.

L'uptake non spécifique (NS) est mesuré en présence de DMI 10⁻⁵ M.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la formule :

$$\frac{(\text{uptake total} - \text{NS}) - (\text{uptake en présence d'inhibiteur} - \text{NS})}{(\text{uptake total} - \text{NS})}$$

L'IC₅₀ est déterminée graphiquement sur la courbe moyenne des pourcentages d'inhibition (4 essais) en fonction du log de la concentration en inhibiteur.

2.1.2. Capture de sérotonine

La méthode a été réalisée d'après Gray et Whittaker (1962, *J. Anat.*, 96 : 79-97). Après homogénéisation du tissu cérébral dans une solution de sucrose, les terminaisons présynaptiques se détachent de l'axone et se referment pour former des synaptosomes obtenus par fractionnement subcellulaire.

Des rats mâles Sprague-Dawley (Janvier) de 180-200 g ont été utilisés. Après sacrifice de l'animal, l'hypothalamus a été prélevé, pesé, homogénéisé au Dounce dans du sucrose 0,32 M à 0°C.

Cet homogénat a été centrifugé 10 mn à 1 000 g (2 400 tours/mn – Hettich, Rotenta). Le surnageant a été récupéré et centrifugé 20 mn à 10 000 g (8 000 tours/mn – Beckam, modèle J2-21 M : rotor J14). Le culot (appelé fraction P₂) a été repris dans du sucrose selon une concentration de 50 mg/ml.

On a incubé pendant 5 mn à 37°C :

- 350 µl de tampon glacé (NaCl 136mM, KH₂PO₄ 2,4mM, K₂HPO₄ 6,9 mM, pH 7,2) préoxygéné 30 mn avant,
- 50 µl de membranes (5 mg/ml final),
- 50 µl de citalopram (10⁻⁵ M final) pour la capture non spécifique,
- 50 µl de ³H-5-HT (50 nM final) (NEN, France, 28,4 Ci/mmol).

Exactement 5 mn après le début de l'incubation, la réaction a été arrêtée par filtration sous vide sur filtres Whatman GF/F (prédilution avec 2,5 ml de tampon glacé puis rinçage avec 3 fois 2,5 ml).

La radioactivité recueillie sur le filtre a été mesurée (Packard Tricarb 4640) par scintillation liquide avec Emulsifier-Safe (Packard).

Les IC₅₀ ont été déterminées en portant graphiquement les pourcentages d'inhibition en fonction du log de la concentration en produit (6 concentrations en duplicate).

2.1.3. Liaison (« Binding ») de la paroxétine

Des rats mâles Sprague-Dawley (Janvier) de 180-200 g ont été utilisés. Les hypothalami de plusieurs rats ont été rassemblés et homogénéisés dans 5 ml de tampon glacé (50 mM Tris-HCL, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 7,5) au Dounce, et l'homogénat centrifugé à 30 000 g (27 000 t/mn – Beckman . L5-50E, rotor T40) pendant 10 mn. Le culot obtenu a été repris dans 5 ml de tampon et recentrifugé dans les mêmes conditions. Le nouveau culot a été repris dans le même tampon et finalement réhomogénéisé au Dounce à une concentration tissulaire de 10 mg/ml. La suspension membranaire (100 µl) a été incubée avec la 3H-paroxétine (NEN, France, 28,6 Ci/mmol) à la concentration (finale) de 0,1 nM, à 20°C, dans un volume final de 1 ml pendant 2 h. Au bout des 2 h d'incubation, la réaction a été arrêtée par filtration sous vide sur filtres Whatman GF/F prétraités dans une solution de polyéthylénimine à 0,05 % 30 mn auparavant (prédilution avec 4 ml de tampon glacé puis rinçage du tube avec 2 fois 4 ml). La radioactivité a été mesurée par spectrométrie de scintillation liquide (Packard, Tricarb 4640) en utilisant l'Emulsifier-Safe (Packard) comme agent scintillant.

Le binding spécifique de la ³H-paroxétine a été défini comme la différence entre le binding total et celui restant en présence de 10 µM de fluoxétine.

Les IC₅₀ ont été déterminées en portant graphiquement les pourcentages d'inhibition en fonction du log de la concentration en produit (6 concentrations en duplicate).

2.1.4. Produits utilisés

F2207 : lot n° 10-CTN3 Clé P118

F2695 : lot n° PL-I-205

F2696 : lot n° PL-I-204C.

2.2. RESULTATS

Les effets du F2207 et de ses deux énantiomères sur la capture de noradrénaline et sérotonine et sur le binding de la paroxétine sont représentés sur un graphe avec en ordonnée le pourcentage d'inhibition en fonction (%) et en abscisse la concentration (M) du F2207, F2695 ou du F2696 (données non montrées). Les valeurs des pourcentages

d'inhibition correspondant à chaque concentration de produit, testée en duplicate, sont les moyennes des résultats de quatre expériences indépendantes.

Les valeurs des IC₅₀ des trois produits ont été déterminées à partir de ces courbes et figurent dans le tableau 2.

5

Tableau 2 : Inhibition des captures de ³H-noradrénaline, ³H-sérotonine et liaison (binding) de la ³H-paroxétine.

IC ₅₀ (M)			
Composés	Capture		Liaison (binding) ³ H-Paroxétine
	³ H-Noradrénaline	³ H-Sérotonine	
F2695	1,5 X 10 ⁻⁸	4,6 X 10 ⁻⁸	6,0 X 10 ⁻⁸
F2207	3,0 X 10 ⁻⁸	15 X 10 ⁻⁸	13 X 10 ⁻⁸
F2696	75 X 10 ⁻⁸	60 X 10 ⁻⁸	70 X 10 ⁻⁸

10 Les trois composés sont actifs sur ces trois tests pharmacologiques, mais des différences existent :

- sur la capture de noradrénaline :

Le F2695 est 2 fois plus actif que le F2207.

Le F2695 est 25 fois plus actif que le F2696.

15 - sur la capture de sérotonine :

Le F2695 est 3 fois plus actif que le F2207.

Le F2695 est 12 fois plus actif que le F2696.

- sur la liaison (binding) de la paroxétine :

Le F2695 est 2 fois plus actif que le F2207.

20 Le F2695 est 10 fois plus actif que le F2696.

Les trois composés sont actifs sur ces tests pharmacologiques avec cependant une moindre activité pour la forme (1R,2S) (F2696) et le racémate (F2207). La forme (1S,2R) du chlorhydrate de Milnacipran (F2695) est 2 à 3 fois plus active que le F2207.

EXEMPLE N°3 : Activité comparative par voie orale du chlorhydrate de Milnacipran racémique (F2207) et de son énantiomère (1S, 2R) actif (F2695) sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle chez le chien vigile.

5 **3.1. INTRODUCTION**

Cette étude se propose d'étudier les effets du F2207 et du F2695 a) en administration unique par voie orale sur la fréquence cardiaque (n = 28 chiens), et b) après traitement réitéré de 5 jours par voie orale sur les pressions artérielles systolique et diastolique chez le chien (n = 6 chiens).

10 Cette étude a été menée à équidoses pharmacologiquement actives de F2207 et F2695 sur des animaux femelles équipés d'implants (Data Sciences International) permettant l'acquisition de la fréquence cardiaque et des paramètres tensionnels par télémetrie. Ces animaux ont été répartis pour toutes les études en 3 groupes de traitement :

- 15 - groupe 1 (témoin) traité à l'eau désionisée,
 - groupe 2 traité au F2207 à la dose de 20 mg/kg/J,
 - groupe 3 traité au F2695 à la dose de 10 mg/kg/J.

3.2. METHODOLOGIE

20 Compte tenu du faible nombre d'animaux simultanément équipés (maximum 8), du nombre de pistes d'enregistrement de l'équipement utilisé (8 pistes), et de sorte à constituer des groupes de traitement homogènes, l'évaluation globale a été réalisée en quatre études, chaque étude étant partitionnée en trois passages (traitement de chaque animal avec chacun des trois produits), séparés par une période de lavage et de ré-
25 initialisation de sondes (« wash-out »). Chaque passage lui-même se déroule en deux phases :

- une première phase durant laquelle tous les animaux sont traités à l'eau désionisée pour une habitude à la contention et au traitement oral par sonde de gavage,
30 - une deuxième phase durant laquelle les animaux reçoivent leur traitement respectif (administration unique pour la fréquence cardiaque, études n° 894 / 926

/ 935 / 936 ; administration réitérée cinq jours pour la pression artérielle, étude n° 894).

Le schéma expérimental global est décrit dans le tableau suivant :

5

Tableau 3 : Schéma expérimental global pour l'étude par télémétrie des effets du chlorhydrate de Milnacipran racémique (F2207) et de son énantiomère (1S, 2R) actif F2695 administrés oralement chez le chien conscient.

GROUPE NUMERO	1	2	3
<u>ANIMAUX</u>			
Nombre	27	28	28
Identification	1 - 2 - 7 - 8 - 13 - 14 (étude 894)	3 - 4 - 9 - 10 - 15 - 16 (étude 894)	5 - 6 - 11 - 12 - 17 - 18 (étude 894)
	1 - 2 - 7 - 8 - 13 - 14 (étude 926)	3 - 4 - 9 - 10 - 15 - 16 (étude 926)	5 - 6 - 11 - 12 - 17 - 18 (étude 926)
	1 - 2 - 9 - 10 11 - 17 - 18 - 19 (étude 935)	3 - 4 - 5 - 12 13 - 20 - 21 - 22 (étude 935)	6 - 7 - 8 - 14 15 - 16 - 23 - 24 (étude 935)
	1 - 2 - 9 - 10 11 - 17 - 18 - 19 (étude 936)	3 - 4 - 5 - 12 13 - 20 - 21 - 22 (étude 936)	6 - 7 - 8 - 14 15 - 16 - 23 - 24 (étude 936)
<u>TRAITEMENT</u>			
Identification	Eau désionisée	F2207	F2695
Dose	-	20 mg/kg	10 mg/kg
Voie	orale
Volume	5 ml/kg

(n = 27 dans le groupe témoin, le signal de sonde de l'animal n° 18 n'ayant pas été enregistré)

Les effets des différents traitements sur la fréquence cardiaque ont été analysés dans les quatre études, après administration unique. L'analyse a porté sur les 13 temps d'acquisition suivants :

- avant traitement unique,
- 5 - toutes les 30 minutes suivant les 6 heures après traitement unique.

Les effets des différents traitements sur la pression artérielle ont été analysés, dans l'étude n° 894 à l'état d'équilibre, à J5, J29 et J33 (dernier jour de traitement effectif pour chacun des passages). L'analyse a porté sur les temps d'acquisition suivants :

- 10 - avant traitement,
- toutes les 30 minutes suivant les 6 heures après traitement.

3.3. RESULTATS

3.3.1. En ce qui concerne la fréquence cardiaque (quatre études poolées), un test de Tukey a été réalisé sur les deltas de fréquence individuels, pour chacun des 12 temps expérimentaux post-traitement, versus la valeur pré-traitement, ainsi que sur les valeurs
15 absolues de fréquence cardiaque à chaque temps d'enregistrement.

Ont été ainsi objectivées, par rapport aux animaux témoins recevant l'eau désionisée :

lorsque l'analyse statistique est réalisée sur les valeurs de deltas, (figure 1) :

- une augmentation significative de la fréquence cardiaque dès la première ½
20 heure suivant administration unique de F2207 (20 mg/kg), augmentation persistant jusqu'à 5.5 heures après traitement ($p \leq 0.001$ pour l'ensemble des temps d'acquisition, à l'exception des temps 0.5 et 5.5 heures - $p \leq 0.01$ – et du temps 5.0 heures - $p \leq 0.05$ – après traitement),
- une augmentation de la fréquence cardiaque après l'administration du F2695 qui
25 reste toujours inférieure à celle obtenue après administration de F2207. De plus, cette différence entre les effets du F2207 et du F2695 est significative ($p < 0.05$) à 1 et 4h après administration en faveur du F2695.
- une augmentation de la fréquence cardiaque qui dure moins longtemps sous
 F2695 (1.0 à 4.5 h) que sous F2207 (persiste jusqu'à 5.5h après traitement).

30 # lorsque l'analyse statistique est réalisée sur des valeurs absolues de fréquence cardiaque, cette même étude met en évidence (figure 2) :

- une augmentation significative de la fréquence cardiaque dès la première heure suivant administration unique de F2207 (20 mg/kg), augmentation persistant jusqu'à 5.5 heures après traitement ($p \leq 0.001$ pour l'ensemble des temps d'acquisition de 1.0 à 4.5 heures, à l'exception du temps 3.5 heures - $p \leq 0.01$; et $p \leq 0.01$ pour le temps d'acquisition 5.5 heures après traitement),
- une augmentation de la fréquence cardiaque après l'administration du F2695 qui reste toujours inférieure à celle obtenue après administration de F2207. De plus, cette différence entre les effets du F2207 et du F2695 est significative ($p < 0.05$) à 1 et 4h après administration en faveur du F2695.
- une augmentation de la fréquence cardiaque qui dure moins longtemps sous F2695 (1.0 à 4.5 h) que sous F2207 (persiste jusqu'à 5.5h après traitement).

3.3.2. En ce qui concerne la pression artérielle (une étude en administration répétée), une valeur moyenne de pression artérielle diastolique (figure 3 et tableau 4), ainsi qu'une valeur moyenne de pression artérielle systolique (figure 4 et tableau 5) ont été calculées pour chaque chien et pour les 6 heures suivant le dernier traitement, après 5 jours consécutifs d'administration. Ces valeurs moyennes de pressions ont été analysées par une ANOVA suivie d'un test de Tukey lorsque cette dernière le permettait (données non montrées).

Ont ainsi été objectivés :

- une augmentation significative ($p \leq 0.001$) de la pression artérielle diastolique après administration répétée 5 jours de F2207 (20 mg/kg/J) ou de F2695 (10 mg/kg/J) comparativement au traitement à l'eau désionisée,
- une différence significative ($p \leq 0.05$) de la valeur de pression artérielle diastolique moyennée suivant administration répétée 5 jours de F2207 (20 mg/kg/J) comparativement à la valeur moyennée de pression artérielle diastolique suivant l'administration répétée de F2695 (10 mg/kg/J),
- aucun effet significatif au niveau de la pression artérielle systolique ; on peut toutefois remarquer que les valeurs de PAS après administration répétée 5 jours de F2695 sont proches des valeurs de PAS suivant traitement à l'eau désionisée.

Les données individuelles de pressions artérielles diastolique et systolique sont présentées dans les tableaux 4 et 5 respectivement.

Tableau 4 : Données individuelles de pression artérielle diastolique

PRESSON ARTERIELLE DIASTOLIQUE (PAD exprimée en mm Hg)
Données individuelles après administration répétée 5 jours consécutifs

GROUPE	1														2														3													
	VEHICULE														F2207 (20 mg/kg/t)														F2695 (10 mg/kg/t)													
TRAITEMENT	1	2	7	8	13	14	Moy. e.s.m.							3	4	9	10	15	16	Moy. e.s.m.							5	6	11	12	17	18	Moy. e.s.m.									
Animal N°	79	77	73	77	101	76	81							4	112	89	93	88	86	91	93							4	73	89	80	71	76	78	78							
Tps avant traitement																																										
Tps après traitement (h)																																										
0.50	84	76	70	63	80	70	74							3	103	106	96	92	88	87	95							3	91	91	99	90	108	85	94							
1.00	82	84	77	72	72	76	77							2	130	117	113	113	90	106	112							5	112	96	75	97	87	96	94							
1.50	102	81	79	75	82	68	81							5	131	127	137	96	100	91	114							8	109	83	88	97	87	112	96							
2.00	83	75	71	98	77	75	80							4	123	113	99	88	107	109	107							5	115	88	93	95	84	109	97							
2.50	85	75	75	84	85	79	81							2	137	111	116	101	115	107	115							5	111	88	97	89	92	107	97							
3.00	91	95	99	85	79	84	89							3	121	118	112	116	106	92	111							4	104	91	96	96	100	106	99							
3.50	83	72	78	73	77	65	75							3	120	106	133	116	103	103	114							5	96	106	94	107	77	103	97							
4.00	81	79	75	77	82	68	77							2	133	114	105	111	110	103	113							4	125	91	99	108	80	109	102							
4.50	82	76	91	84	113	85	89							5	135	110	126	109	104	108	115							5	103	104	92	100	85	108	99							
5.00	97	79	67	95	81	82	84							5	116	120	98	97	97	105	106							4	126	100	92	95	110	102	104							
5.50	94	80	70	ND	85	82	82							4	103	107	115	106	92	93	103							4	88	86	105	98	89	99	94							
6.00	83	74	82	82	78	77	79							1	115	133	120	104	103	104	113							5	101	113	98	105	109	108	106							
PAD moyenne après traitement	87	79	78	81	83	76	81							2	122	115	114	104	101	101	110							4	107	95	94	98	92	104	98							

ND : non déterminé

Tableau 5 : Données individuelles de pression artérielle systolique

PRESSION ARTERIELLE SYSTOLIQUE (PAS exprimée en mm Hg)
Données individuelles après administration répétée 5 jours consécutifs

GROUPE	1														2												3																	
	VEHICULE														F2207 (20 mg/kg/J)												F2695 (10 mg/kg/J)																	
TRAITEMENT																																												
Animal N°	1	2	7	8	13	14	Moy. e.s.m.								3	4	9	10	15	16	Moy. e.s.m.						5	6	11	12	17	18	Moy. e.s.m.											
Tps avant traitement	139	141	120	157	172	138	145								7	188	164	176	149	130	169	163						8	136	141	138	130	134	149	138						3			
Tps après traitement (h)																																												
0.50	135	132	119	131	149	138	134								4	158	154	152	128	126	129	141						6	135	129	140	135	160	139	140						4			
1.00	134	158	129	144	141	143	142								4	180	167	157	150	126	130	152						9	159	135	124	148	131	143	140						5			
1.50	158	151	145	150	153	137	149								3	186	181	189	129	136	138	160						12	164	119	138	158	127	156	144						8			
2.00	138	136	145	173	151	144	148								5	171	160	146	122	140	163	150						7	168	125	135	141	127	156	142						7			
2.50	142	143	145	159	160	148	150								3	195	168	168	144	153	161	165						7	165	124	142	141	134	154	143						6			
3.00	149	167	162	163	150	154	158								3	173	177	164	157	141	146	160						6	156	131	145	144	151	157	147						4			
3.50	135	129	149	154	153	137	143								4	165	153	184	167	139	155	161						6	146	147	141	169	123	156	147						6			
4.00	142	143	149	166	164	144	151								4	180	157	151	154	150	153	158						5	180	132	145	160	124	164	151						9			
4.50	137	140	159	170	190	152	158								8	184	161	180	155	145	168	166						6	158	151	138	163	131	163	151						5			
5.00	150	146	127	177	160	145	151								7	161	171	146	141	139	166	154						6	182	144	137	150	162	158	156						6			
5.50	153	149	132	ND	148	144	145								4	151	154	173	152	132	155	153						5	142	127	152	153	141	153	145						4			
6.00	146	144	151	176	146	143	151								5	158	192	171	154	148	172	166						7	156	170	148	159	160	166	160						3			
PAS moyenne après traitement	143	145	143	160	155	144	148								3	172	166	165	146	140	153	157						5	159	136	140	152	139	155	147						4			

ND : non déterminé

3.4. CONCLUSION

Dans les conditions expérimentales de la présente évaluation, menée en quatre études successives par administration orale chez le chien vigile appareillé en télémetrie :

□ en administration unique et comparativement au groupe témoin (n = 28),
5 l'augmentation de la fréquence cardiaque est nettement significative et durable avec le F2207 à la dose de 20 mg/kg/J ; elle est statistiquement et cliniquement moindre et plus fugace avec le F2695 à la dose pharmacologiquement équivalente de 10 mg/kg/J,

□ le F2695, à la dose de 10 mg/kg/J, ne provoque aucune modification statistiquement significative de la pression artérielle systolique moyennée sur les 6
10 heures suivant le dernier traitement, à l'état d'équilibre après administration répétée 5 jours,

□ une différence statistiquement significative est mise en évidence sur les valeurs de la pression artérielle diastolique moyennée sur les 6 heures suivant le dernier traitement, à l'état d'équilibre après administration répétée 5 jours, entre l'énantiomère
15 actif F2695 (98 ± 2 mm Hg) et le racémique F2207 à équidoses pharmacologiquement actives (110 ± 4 mm Hg).

Ces différences témoignent clairement d'une meilleure tolérance cardiovasculaire de l'énantiomère actif F2695.

20 EXEMPLE 4 : TEST de PREDICTIVITE PHARMACO-TOXICO-GENOMIQUE IN VITRO.

4.1. MATERIELS ET METHODES

Les composés F2695 et F2696, énantiomères de la molécule racémique F2207, ainsi qu'un produit de référence, la clomipramine (codée dans l'essai C218) ont été
25 évalués au cours de la présente étude. Les deux énantiomères F2695 et F2696 ont été tout d'abord évalués dans un test préliminaire de cytotoxicité (test au MTT) sur des hépatocytes primaires de rat, de façon à sélectionner les trois concentrations à utiliser dans le test définitif.

Après traitement d'hépatocytes primaires de rat en culture, l'ARN a été extrait de
30 façon à générer des sondes d'ADN complémentaire marquées, qui ont été ensuite hybridées sur une membrane contenant 682 fragments d'épissage alternatif spécifiques

du stress cellulaire. Des index de toxicité ont été obtenus, pour chaque produit testé, en comparant le profil d'hybridation des cellules traitées avec celui obtenu à partir de cellules non traitées.

4.1.1. Principe et but de l'étude

5 Safe-Hit est un test de pharmaco-toxicogénomique prédictif sensible, robuste, fiable, rapide et sûr qui permet la comparaison et le classement de produits, basé sur l'évaluation optimisée de leur potentiel toxique.

Safe-Hit bénéficie d'une technologie, propriété de EXONHIT (DATASTM : *Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing*), permettant d'isoler et, 10 par conséquent, de cloner les événements d'épissage résultant d'un état biologique donné, comparativement à une condition contrôle. Cela permet l'isolement d'isoformes d'ARNm, exprimées différemment en fonction de la condition biologique.

Safe-Hit permet le classement des molécules au sein d'une série chimique, en fonction d'un Index Toxique, déterminé après les étapes de base suivantes 15 (systématiquement mises en œuvre en duplicate pour chaque produit) :

- traitement des lignées cellulaires avec les différents produits, à trois concentrations déduites d'un test préalable de toxicologie cellulaire (test MTT) : une concentration de référence correspondant à 80% de viabilité cellulaire, une concentration 10 fois supérieure – quand cela est possible – et une concentration 10 fois inférieure, 20
- préparation de l'ARN total et des sondes radiomarquées de cADN correspondantes,
- hybridation des sondes de cADN : Safe-Hit macro-array contenant 682 clones indépendants, correspondant à des modifications d'épissage induites par la 25 surexpression de WTP53 (p53 est le « médiateur » le plus ubiquitaire du stress cellulaire choisi pour le développement de cette méthodologie),
- acquisition et détermination de l'Index de Toxicité.

4.1.2. Cellules

Les cellules utilisées pour l'étude (test MTT préalable de cytotoxicité et test 30 principal) sont des hépatocytes cryopréservés de rat Sprague-Dawley en primoculture (lots Hep184005 et Hep184006 - Biopredic), cultivés en conditions standard.

4.1.2.1 Milieux de culture

- milieu de décongélation : milieu de Leibovitz 15 avec glutamax 1, additionné de 100 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,6 M de glucose (lot MIL 210009 – Biopredic),
- 5 - milieu d'ensemencement : milieu de Williams E avec glutamax 1, additionné de 100 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 4 µg/ml d'insuline bovine et 10 % v/v de sérum de veau fœtal (lot MIL 260005) – Biopredic),
- milieu d'incubation : milieu de Williams E avec glutamax 1, additionné de 100 IU/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 4 µg/ml d'insuline bovine et
10 50 µM d'hémisuccinate d'hydrocortisone (lot MIL 260009-260007 – Biopredic).

4.1.2.2 Conditions de culture

37°C, atmosphère CO₂ (5%), hygrométrie relative (95%).

4.1.2.3 Procédé de culture

	Test de toxicité cellulaire	Etude principale
	Cellules ensemencées le jour du traitement	
Densité d'ensemencement	35 000 cellules / puits (plaque 96 puits)	1,5 million de cellules par plaque de 30 mm
Volume de milieu	0,1 ml	3 ml

15

4.1.3. Test de cytotoxicité

Ce test de cytotoxicité (test MTT) détecte les cellules vivantes grâce à une réaction colorimétrique qui révèle l'intégrité de la respiration cellulaire impliquant l'activité des mitochondries. Le MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), soluble dans l'eau, est transformé par clivage, sous
20 l'action d'une enzyme mitochondriale des cellules vivantes, en un formazan pourpre insoluble. Le formazan est solubilisé dans un solvant organique et la solution obtenue peut être mesurée par spectrophotométrie. L'absorbance mesurée est proportionnelle au nombre de cellules survivantes.

25 Les cellules sont mises en contact pendant 16 heures avec le produit à tester à 5 concentrations différentes (0 – 1 – 10 – 25 – 50 et 100 µM).

Après cette phase d'exposition, une solution de MTT (0,5 mg/ml dans le milieu d'incubation des hépatocytes primaires) est ajoutée pendant 3 heures. Après

solubilisation des cristaux de formazan, les plaques multi puits sont lues par un spectrophotomètre à 500 nm afin de déterminer le pourcentage de viabilité cellulaire.

4.1.4 Etude principale de pharmaco-toxicogénomique

L'étude principale est réalisée en duplicate, à partir des culturesensemencées et exposées à chaque produit, afin d'accroître la cohérence entre les expériences et valider les résultats obtenus.

4.1.4.1 Ensemencements cellulaires et traitement

Les cellules sont ensemencées et cultivées pendant 16 heures avec chaque produit, aux trois concentrations choisies à partir du test préalable MTT ; deux contrôles (cellules non traitées, solvant seul) sont ajoutés pour la série.

4.1.4.2 Extraction de l'ARN total et dosage

Après traitement, l'ARN est extrait et analysé comme suit :

- recueil des cellules et centrifugation,
- extraction réalisée avec un réactif phénol prêt-à l'emploi (Trizol – lot 1106266 et 1121067 – Invitrogen) suivant le protocole du fabricant,
- solubilisation de l'ARN dans l'eau,
- dosage de l'ARN en spectrophotométrie (densité optique mesurée à 260, 280 et 300 nm),
- vérification de la qualité de l'ARN par Agilent.

4.1.4.3 Préparation des sondes d'ADNc

Les sondes d'ADNc sont préparées par transcription inversée radioactive (alpha dATP ³³P – Amersham). La quantification d'ADNc radioactif (Instant Imager - Packard) est réalisée pour confirmer l'activité des sondes.

4.1.4.4 Hybridation sur membrane Safe-Hit

Sur les membranes Safe-Hit en nylon prédécoupé (Q-BIOgene) sont déposés en double 682 clones DATAS (motifs d'épissage alternatif), à l'aide d'un appareillage de Q-Pix (GENETIX). Les sondes d'ADN sont hybridées durant la nuit sur les membranes, puis celles-ci sont lavées.

4.1.1.5. Préparation des sondes d'ADNc :

- matrice : 5 µg d'ARN total (pour chaque série de traitement et pour chaque concentration),
- amorce : 100 ng d'oligonucléotide oligo-dTV, pour la 1ère et 2ème hybridation

sur le rat (lot 12.00, Invitrogen),

- mélange principal :

- 10 µl de tampon First Strand 5x Premier (lot 1131226 - Invitrogen)
- 1 µl dCTP+dGTP+dTTP 20 mM (lot 1105201 - Invitrogen)
- 5 1 µM d'ATP 120 µM (lot 1105201 - Invitrogen)
- 5 µl Dithiothréitol (DTT) 0,1 M (lot 133609 - Invitrogen)
- 1 µl RNase Out 40 U (lot 1113345 - Invitrogen)
- 5 µl d' α ³³P dATP 3 000Ci/mmol 10 mCi/µl (lot B0239 - Amersham)
- 4 µl Superscript II (lot 1137806 - Invitrogen)
- 10 1 µl de glycogène (lot 1129328 - Invitrogen)

- *procédure* :

- incuber l'ARN et l'oligo-dTV à 70°C pendant 10 minutes puis mettre dans la glace. Ajouter 27 µl de MasterMix puis incuber à 43°C / 1h puis à 50°C / 15 minutes. Ajouter 20 µl d'eau, puis 20 µl d'EDTA 50 mM, puis 4 µl de NaOH 15 10N. Incuber 20 minutes à 65°C puis mettre dans la glace.

- Quantification : Instant Imager, Packard : 1 µl de mélange réactionnel, ajouter 8 µl d'acide acétique, 100 µl d'isopropanol et 1 µl de glycogène (20 µg/µl). Incuber à -20°C pendant 20 minutes, centrifuger 20 minutes à 13000 t/mn à 4°C. Remettre en suspension dans 200µl d'eau,
- 20 quantification : Instant Imager, Packard : 1 µl de mélange réactionnel.

- *Milieus et tampons*

Solutions communes :

20X SSC (Invitrogen)
 50X Denhardt's
 50 % (w/v) Sulfate de Dextran (ICN)
 20 % SDS (v/v)(Quantum biotech.)
 10 mg/ml ADN de sperme de saumon (Q-Biogene)

Tampon de pré-hybridation :

6X SSC
 10X Denhardt's
 10 % Sulfate de Dextran
 0,5 % SDS
 H₂O

Tampon de lavage 1 :

2X SSC

Tampon de lavage 2 :

2X SSC
 0,1 % SDS

Tampon d'hybridation:

5X SSC
5X Denhardt's
0.1 % SDS
H₂O

Tampon de lavage 3 :

0,5X SSC
0,1 % SDS

Tampon de lavage 4 :

1X SSC
0,1 % SDS

- Pré-Hybridation :

Aliquoter 5ml de tampon de pré-hybridation dans les tubes d'hybridation,
ajouter le volume correspondant d'ADN de sperme de saumon pour une
concentration finale de 100µg/ml,
imbiber les membranes de 5X SSC,
placer la membrane dans le tube d'hybridation et pré-hybrider 2 heures à
65°C.

- Hybridation :

Eliminer le tampon de pré-hybridation et rincer avec 10-20ml de 5X SSC,
éliminer le 5 X SSC, remplacer par 5ml de tampon + ADN de sperme de
saumon, dénaturer les sondes RT par 5 mn à 95°C, puis placer sur la glace /
1 minute, centrifuger pour reconstitution, puis récupérer le volume approprié
de sondes RT dénaturées dans le tube (100.000 à 200.000 cpm/ml), incubé
une nuit à 55°C.

- Lavage :

Rincer les membranes avec 10-20 ml de tampon de lavage 1,
éliminer le tampon et le remplacer par 50 ml de tampon de lavage 2,
incuber 30 mn à 55°C, puis éliminer et remplacer en lavant avec le tampon 4,
incuber 30mn à 55°C, puis décanter le lavage final, ôter les membranes des
tubes, placer sur une cassette et laissez l'acquisition se faire pendant 3
heures.

4.1.4.5 Acquisition et Analyse d'image

Les membranes sont placées sur un écran (FX Imaging ScreenK - Bio-
rad) pendant 3 heures. Le film est ensuite lu en utilisant un Personal Molecular
Imager FX (Bio-rad). L'analyse d'image est réalisée en employant le Safe-Hit

Reader Software (COSE).

4.1.4.6 Calcul de l'Index de Toxicité

Toutes les données sont transférées dans un programme de calcul automatique qui normalise les différentes membranes et calcule un Index de Toxicité = somme du nombre de gènes up-régulés et down-régulés par un composé donné à une concentration donnée, comparativement aux résultats des contrôles non traités. Les résultats des deux analyses Safe-Hit sont alors comparés et combinés pour évaluer la toxicité potentielle des divers composés testés. Deux paramètres modifiables par l'utilisateur sont impliqués dans le calcul d'Index de Toxicité:

□ le Background Threshold (BT) lisse les signaux faibles, proches du bruit de fond et non attribuables à une expression significative de gène. Il détermine donc le seuil de détection ;

□ le Facteur d'Induction (IF) est déterminé comme étant le facteur multiplicateur, versus les échantillons de contrôle, pour que les clones soient up ou down régulés. La valeur de ce paramètre est généralement 2 ou au dessous de 2 pour obtenir des résultats pertinents. L'augmentation progressive de la valeur de l'IF sélectionne les clones qui sont de plus en plus fortement up ou down régulés.

Le procédé de calcul de l'Index de Toxicité a été développé par comparaison des profils de référence (R : cellules non traitées) avec un profil expérimental (E) et suit les étapes suivantes (voir figure 5) pour une vue schématique du procédé) :

- transformation de toutes les valeurs obtenues en valeurs log,
- calcul de la moyenne des valeurs log pour chacun des essais dupliqués (M_{iR} et M_{iE}),
- établissement d'une matrice avec $M_{iR} - M_{iE}$ pour tous les signaux ($= D_i$),
- normalisation des M_{iE} individuelles en soustrayant à M_{iE} la médiane des 14 valeurs proximales de D_i ($= NM_{iE}$),
- comparaison des valeurs normalisées avec les valeurs référence ($C_i = NM_{iE} - M_{iR}$),

- transformation exponentielle de $C_i (= F_i)$,
- comparaison de F_i avec le Facteur d'Induction choisi par l'utilisateur :
 - si $F_i > IF$, le gène est considéré comme up-régulé,
 - si $1/IF < F_i < IF$, le gène est exprimé sans modification,
 - si $F_i < 1/IF$, le gène est considéré comme down-régulé.

4.2. RESULTATS DU TEST AU MTT

Ces tests ont été réalisés en triplicate sur des hépatocytes primaires de rat exposés pendant 16 heures.

La clomipramine, référencée C218, présente une toxicité importante à 100 μM puisqu'aucune viabilité n'est observée après exposition des cellules pendant 16 heures. En revanche, aucune toxicité n'est observée à 25 μM . A 50 μM , la viabilité supérieure à 80% est tout à fait compatible avec une étude pharmaco-toxicogénomique. Les composés F2695 et F2696 ne présentent aucune cytotoxicité dans ce test, même à la concentration de 100 μM .

Pour réaliser les évaluations pharmaco-toxicogénomiques, 3 concentrations d'un même composé sont utilisées : la concentration qui permet d'obtenir 80% de viabilité (C), ainsi que les concentrations qui correspondent à $(C) \times 10$ et à $(C)/10$.

De façon à comparer la capacité de F2695 et F2696 à produire un score dans le test mis en œuvre, les mêmes concentrations ont été utilisées pour chacun d'entre eux : 1 μM , 10 μM et 100 μM . Dans le cas de la clomipramine, les concentrations de 1 μM , 10 μM et 50 μM ont été utilisées. Voir les figures 6a, 6b et 6c.

4.3 RESULTATS SUR HEPATOCYTES PRIMAIRES DE RAT

Les Index de toxicité (IT) ont été déterminés comme décrit ci-dessus. Dans ces index, n'ont été pris en compte que les clones qui ont été trouvés modulés par rapport aux contrôles dans les deux expériences indépendantes, ne considérant que les clones dont le signal est 2 fois supérieur au bruit de fond (BT). Deux analyses différentes ont été réalisées en prenant deux niveaux de différence (Facteur d'Induction - IF) par rapport à la situation non traitée :

- au moins 1,7 fois par rapport à la situation non traitée. Ce facteur de 1,7 fois représente la valeur la plus faible qui permet de ne pas obtenir d'index lors de la comparaison de deux situations non traitées.

- au moins 2 fois par rapport à la situation non traitée. Ce facteur de 2 fois permet de prendre en compte les signaux les plus robustes.

4.3.1. Facteur d'induction de 1,7 par rapport à la situation non traitée (tableau 6)

Tableau 6: Clones « up- et down-régulés » avec des hépatocytes primaires de rat (Facteur d'Induction = 1,7 fois)

	F2695 -1µM	F2695 -10µM	F2695 -100µM	F2696 -1µM	F2696 -10µM	F2696 -100µM	C218- 1µM	C218- 10µM	C218- 100µM
Up >1,7			1			15	2	2	13
Down <0,58 8			1	2	5	7	7	13	15
TI			2	2	5	22	9	15	28

Pos	nb U	nb D	Gene									
A09	3						2,90	2,23	2,14	H. sapiens mitochondrion, 12S		
A20		1				0,56				H. sapiens initiation factor eIF-5A gene		
B20		2						0,14	0,27	H. sapiens chromosome 19, BAC CIT-B-191n6		
B22		2						0,17	0,32	H. sapiens Genomic sequence from 17		
C01	4						1,93	1,82	1,91	H. sapiens mitochondrion, 16S		
E01	1								1,73	H. sapiens mRNA for lipocortin II		
E05		2						0,22	0,35	H. sapiens DNA sequence from clone 740A11 on chromosome Xq22.2-23. Contains part of the		
										COL4A5 gene for Collagen Alpha 5 (IV) Chain Precursor. Contains GSS1, complete sequence		
E11	1					2,12				H. sapiens chloroquine reductase homolog liver, mRNA		
E19	1								1,72	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1		
E21		2						0,56	0,58	H. sapiens ribosomal protein S14 gene		
F24		1							0,52	H. sapiens LIM homeobox protein cofactor (CLIM-1) mRNA		
G01	1								2,04	H. sapiens estrogen receptor-related protein (variant ER from breast cancer) mRNA		
G05	1								2,02	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1		
G09	2					2,09			1,76	H. sapiens mitochondrion, cytochrome b		
I01	1					2,05				H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1		
I18	2					2,38			1,88	H. sapiens 18S rRNA gene		
L01	1					2,05				H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA		
L22	1					1,78				H. sapiens mRNA for Lon protease-like protein		

L23	1										1,75	H. sapiens cDNA NIH_MGC_16 clone IMAGE:3350241 5', mRNA sequence
M07	2						2,25				1,75	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit I
M12		3					0,21		0,16	0,39		H. sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C1563
M23	1						1,95					Sequence Z1 from patent US 5851764
P05	1						1,78					H. sapiens PAC clone DJ404K21 from Xq23
Q11	2					1,81				1,92		unk
Q24	1						1,77					H. sapiens 28S ribosomal RNA gene
S01	1									2,98		Mus musculus TCR beta locus
T08		6			0,50	0,22	0,20	0,35	0,14	0,22		H. sapiens mRNA for KIAA1185 protein
U04		6			0,57	0,26	0,19	0,48	0,22	0,37		H. sapiens translation initiation factor eIF-2alpha mRNA
V22												H. sapiens mRNA for elongation factor 1-alpha (clone CEF4)
W17	1						2,96					H. sapiens mitochondrion, hypoxia inducible gene-14
X02		5					0,29	0,20	0,36	0,24	0,31	unk
X05		2							0,15	0,24		H. sapiens microsomal epoxide hydrolase (EPHX) gene
X06		5					0,2	0,16	0,23	0,15	0,23	H. sapiens Genomic sequence from 9q34
X23	1							1,92				unk
Y17	1											H. sapiens 28S ribosomal RNA gene
Z13		3							0,34	0,29	0,27	unk
Z20		1									0,57	Homo sapiens cDNA wc44h09,x1 NCI_CGAP_Pt28 clone IMAGE:2321537 3' similar to
												SW:RB24_Mouse P35290 RAS_RELATED PROTEIN RAB-24;; mRNA sequence
AA11		3							0,38	0,27	0,31	H. sapiens Repeat sequence AluIb fragment inserted into a cDNA coding for an unknown protein
AA13	1										1,79	H. sapiens 18S rRNA gene
AC13		5					0,22	0,16	0,28	0,16	0,28	H. sapiens 7S rRNA L gene

Les index de toxicité suivants ont été obtenus :

F2695	Index de Toxicité
1 μ M	0
10 μ M	0
100 μ M	17

F2696	Index de Toxicité
1 μ M	2
10 μ M	5
100 μ M	22

C218	Index de Toxicité
1 μ M	9
10 μ M	15
50 μ M	28

5

Le classement suivant peut donc être établi, du plus toxique au moins toxique C218 (clomipramine) > F2696 >>> F2695.

La clomipramine, molécule de référence codée dans le présent essai C218, montre une augmentation des signatures en relation avec les concentrations testées :
10 respectivement 9, 15 et 28 signatures aux concentrations de 1, 10 et 50 μ M (concentration maximale définie dans le test préalable de cytotoxicité). Fort logiquement, la totalité des signatures survenant aux concentrations faible et moyenne est retrouvée aux concentrations supérieures.

Aux concentrations de 1 et 10 μ M, le F2695 n'induit aucune signature sur les
15 682 possibles signatures de stress testées dans le présent essai. A la concentration la plus élevée de 100 μ M, seules sont identifiées deux signatures, dont une commune avec le C218 mais de signification inconnue.

Le F2696 montre une augmentation des signatures en relation avec les concentrations testées : respectivement 2, 5 et 22 signatures aux concentrations de 1, 10
20 et 100 μ M. La totalité des signatures survenant aux concentrations faible et moyenne est retrouvée aux concentrations supérieures. Aucune des 22 signatures n'est commune avec le F2695. En revanche, les signatures qui apparaissent aux concentrations faible et

moyenne (5 dont les 2 présentes dès la faible concentration), font toutes les 5 partie des 9 signatures objectivées pour la clomipramine dès la faible dose de 1 μ M. A la forte concentration de 100 μ M, 10/26 signatures du F2696 sont retrouvées parmi les 28 identifiées avec la clomipramine à 50 μ M.

- 5 Sur le plan qualitatif, est à souligner pour le F2696 et la clomipramine l'impact sur les transcrits mitochondriaux, notamment au niveau de la Cox1 et du cytochrome b. Ces signatures ne sont pas présentes avec le F2695 (positions G05/G09/I01).

4.3.2. Facteur d'induction de 2 par rapport à la situation non traitée (tableau 7)

Tableau 7: Clones « up- et down-régulés » avec des hépatocytes primaires de rat (Facteur d'Induction = 2 fois)

	F2695- 1µM	F2695- 10µM	F2695- 100µM	F2696- 1µM	F2696- 10µM	F2696- 100µM	C 218- 1µM	C 218- 10µM	C 218- 100µM
Up >1,7						10	1	1	4
Down <0,588					5	6	7	12	12
TI					5	16	8	13	16

Pos	nb U	nb D	Gene						
A09	3				2,90	2,23	2,14	H. sapiens mitochondrion, 12S	
B20		2				0,14	0,27	H. sapiens chromosome 19, BAC CIT-B-19In6	
B22		2				0,17	0,32	H. sapiens Genomic sequence from 17	
C01	1							H. sapiens mitochondrion, 16S	
E05		2				0,22	0,35	H. sapiens DNA sequence from clone 740A11 on chromosome Xq22.2-23. Contains part of the COL4A5 gene for Collagen Alpha 5 (IV) Chain Precursor. Contains GSS1, complet sequence	
E11	1				2,12			H. sapiens chlorocone reductase homolog liver, mRNA	
G01	1						2,04	H. sapiens estrogen receptor-related protein (variant ER from breast cancer) mRNA	
G05	1						2,02	H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1	
G09	1				2,09			H. sapiens mitochondrion, cytochrome b	
I01	1				2,05			H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1	
I18	1				2,38			H. sapiens 18S rRNA gene	
J03	1				2,12			H. sapiens CLP mRNA	
L01	1				2,05			H. sapiens divalent cation tolerant protein CUTA mRNA	
M07	1				2,25			H. sapiens mitochondrion, cytochrome c oxidase subunit 1	
M12		3			0,21	0,16	0,39	H. sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C1563	
S01	1						2,98	Mus musculus TCR beta locus	

Les index suivants ont été obtenus :

F2695	Index de Toxicité
1 μ M	0
10 μ M	0
100 μ M	0

C218	Index de Toxicité
1 μ M	8
10 μ M	13
50 μ M	16

F2696	Index de Toxicité
1 μ M	0
10 μ M	5
100 μ M	16

Selon ces paramètres, le classement suivant peut être proposé, du plus toxique au moins toxique : C218 (clomipramine) > F2696 >>>>> F2695.

En considérant les clones sur- ou sous-exprimés d'un facteur 2, le F2695 n'induit aucune signature, même à la concentration de 100 μ M.

L'effet de la concentration sur l'apparition des signatures se confirme par la disparition des signatures de faible intensité pour le F2696 à 1 μ M, présentes dans l'analyse précédente avec un facteur d'induction de 1,7.

Sur le plan qualitatif, l'impact du F2696 et de la clomipramine sur la Cox1 et le cytochrome b est également confirmé (positions G05/G09/I01).

Le F2695, énantiomère pharmacologiquement actif du F2207, est dépourvu d'impact significatif dans ce test, alors que la clomipramine est utilisée comme produit de référence témoin positif.

En revanche, le F2696, énantiomère inactif du F2207 présente un profil de signatures quantitativement et qualitativement proche de la clomipramine, et ne présente aucune signature commune avec le F2695.

Tout ceci témoigne d'un meilleur profil toxicogénomique pour l'énantiomère actif F2695 dont, sur ce modèle expérimental, le coefficient de sécurité est très significativement meilleur que pour le F2696.

4.4 CONCLUSION

5 Les études pharmaco-toxicogénomiques réalisées sur les molécules F2695 et F2696, énantiomères du F2207 (aux concentrations de 10, 50 et 100 μ M), et C218 (clomipramine, aux concentrations de 1, 10 et 50 μ M), à partir d'hépatocytes de rat en primoculture, ont permis d'obtenir des signatures de stress et des index de toxicité concentration-dépendants. Ces études confirment la capacité du test pharmaco-
10 toxicogénomique à révéler des signatures de stress dans des conditions de traitement (concentrations, durée de traitement) qui ne provoquent aucune toxicité dans un test classique de viabilité tel que le MTT.

Plusieurs faits marquants se dégagent de cette étude :

□ sur ce modèle d'hépatocytes primaires de rat, seul le F2695, énantiomère
15 pharmacologiquement actif du F2207, n'induit pas d'index de toxicité significatif ;

□ le F2696, énantiomère inactif du F2207, et la clomipramine, psychotrope de référence, induisent des index importants formés de signatures de stress communes ou très proches. Dans ce système, la clomipramine, molécule de référence produit positif, est le produit induisant le plus de signatures de stress, des index significatifs étant
20 obtenus dès les concentrations les plus faibles. A ce titre, il est intéressant de mentionner que la clomipramine peut induire un certain nombre d'effets indésirables chez l'homme tels par exemple la tachycardie, l'hypotension orthostatique, des troubles de la conduction ou du rythme, et exceptionnellement des hépatites. En cas de surdosage accidentel à la clomipramine, on peut observer entre autres des syncopes, des
25 troubles hématologiques, des manifestations cardiovasculaires sévères.

Sans préjuger d'une identité de mécanisme physiopathologique, il est intéressant de noter que F2696 présente des signatures de stress communes ou très proches de celles de la clomipramine et induit également des effets indésirables tels que les troubles cardiovasculaires précédemment décrits.

30 Il est ainsi légitime d'avancer que les signatures observées sont indépendantes de tout profil antidépresseur ou plus largement psychotrope. Elles doivent bien en revanche

être considérées comme des « signatures de stress » (le F2696 provoque en particulier une diminution d'expression d'un gène impliqué dans la synthèse protéique et d'un facteur d'initiation de translation). Tout ceci témoigne d'un meilleur profil toxicogénomique pour l'énantiomère actif F2695 dont, sur ce modèle expérimental, le

5 coefficient de sécurité est très significativement meilleur que pour le F2696.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un mélange d'énantiomères du Milnacipran (Z(\pm))-2-(aminométhyl)-N,N-diéthyl-1-phénylcyclopropanecarboxamide) et/ou d'au moins un de ses métabolites, ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, ledit mélange étant enrichi en énantiomère (1S,2R), pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir ou traiter des affections ou pathologies par inhibition double de la re-capture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA), tout en limitant les risques de troubles cardiovasculaires.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les troubles cardiovasculaires correspondent à une élévation de la pression artérielle et/ou une augmentation de la fréquence cardiaque.
3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'élévation de la pression artérielle correspond à une élévation de la pression artérielle diastolique.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, tout en limitant en outre les risques de toxicité organique et/ou tissulaire.
5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la dite toxicité organique est la toxicité cardiaque et la dite toxicité tissulaire est la toxicité hépatique et/ou rénale.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que le dit énantiomère (1S,2R) du Milnacipran est le chlorhydrate de Z-(1S,2R)-2-(aminométhyl)-N,N-diéthyl-1-phénylcyclopropanecarboxamide (F2695).
7. Utilisation l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le dit métabolite est sélectionné parmi :
 - le chlorhydrate de l'acide Z-phényl-1-aminométhyl-2-cyclopropane carboxylique (F1567),
 - le phényl-3 méthylène-3-4-pyrrolidone-3 (F1612),
 - le chlorhydrate de Z-(para-hydroxyphényl)-1 diéthylaminocarbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2782),

- l'oxalate acide de Z-phényl-1-éthylamino carbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2800), et
 - le chlorhydrate de Z-phényl-1 aminocarbonyl-1 aminométhyl-2 cyclopropane (F2941).
- 5 8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que le dit métabolite est le chlorhydrate de Z-(para-hydroxyphényl)-1-diéthylaminocarbonyl-1 aminométhyl-2-cyclopropane (F2782).
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le ratio massique entre l'énantiomère (1S,2R) et l'énantiomère (1R,2S) dans
10 le dit mélange est supérieur à 95:5 ((1S,2R) : (1R,2S)), de préférence supérieur à 99:1, de manière encore plus préférée supérieur à 99,5:0,5.
10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le dit mélange d'énantiomères est substantiellement pur en
chlorhydrate de Z-(1S,2R)-2-(aminométhyl)-N,N-diéthyl-1-phénylcyclo
15 propanecarboxamide (F2695).
11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce le dit mélange d'énantiomères est substantiellement pur en chlorhydrate de Z-(para-hydroxyphényl)-1-diéthylaminocarbonyl-1-aminométhyl-2-cyclopropane (F2782).
- 20 12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le médicament est destiné à traiter ou prévenir une pathologie ou affection sélectionnée dans le groupe composé de la dépression, notamment la dépression profonde, la dépression résistante, la dépression du sujet âgé, la dépression psychotique, la dépression induite par des traitements interféron, l'état dépressif,
25 le syndrome maniaco-dépressif, les épisodes dépressifs saisonniers, les épisodes dépressifs liés à une condition médicale générale, les épisodes dépressifs liés à des substances agissant sur l'humeur, le syndrome bipolaire, la schizophrénie, l'anxiété généralisée, les états de morosité et de marasme, les maladies liées au stress, les attaques de panique, la phobie, notamment l'agoraphobie, les troubles obsessionnels compulsifs, les troubles de la conduite, les troubles
30 oppositionnels, les syndromes de stress post-traumatiques, la dépression du

- système immunitaire, la fatigue et les syndromes de douleur qui l'accompagnent, le syndrome de fatigue chronique, la fibromyalgie, et autres pathologies de nature somatique fonctionnelle, l'autisme, les pathologies caractérisées par une absence d'attention dues à des conditions médicales générales, les troubles de l'attention dus à de l'hyperactivité, les troubles des conduites alimentaires, la névrose boulimique, la névrose anorexique, l'obésité, les désordres psychotiques, l'apathie, la migraine, la douleur, et notamment la douleur chronique, le syndrome du colon irritable, les maladies cardiovasculaires, et notamment le syndrome anxio-dépressif dans l'infarctus du myocarde ou dans l'hypertension, les maladies neuro-dégénératives et les syndromes anxio-dépressifs associés (maladie d'Alzheimer, Chorée de Huntington, maladie de Parkinson), les incontinences urinaires, notamment l'incontinence urinaire liée au stress et l'énurésie, la dépendance aux drogues, et notamment l'anxio-dépendance au tabac, à l'alcool, aux stupéfiants, aux drogues, aux antalgiques lors du sevrage de ces états de dépendance.
13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la dite pathologie est sélectionnée dans le groupe composé de la dépression, notamment la dépression profonde, la dépression résistante, la dépression du sujet âgé, la dépression psychotique, la dépression induite par des traitements interféron, l'état dépressif, le syndrome maniaco-dépressif, les épisodes dépressifs saisonniers, les épisodes dépressifs liés à une condition médicale générale, les épisodes dépressifs liés à des substances agissant sur l'humeur.
14. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la dite pathologie est sélectionnée dans le groupe composé de la fatigue et les syndromes de douleur qui l'accompagnent, le syndrome de fatigue chronique, la fibromyalgie, et autres pathologies de nature somatique fonctionnelle.
15. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la dite pathologie est sélectionnée dans le groupe composé des incontinences urinaires, notamment l'incontinence urinaire liée au stress et l'énurésie.
16. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la dite affection est sélectionnée parmi la dépendance aux drogues, et notamment l'anxio-

dépendance au tabac, à l'alcool, aux stupéfiants, aux drogues, aux antalgiques lors du sevrage de ces états de dépendance.

17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, chez des patients choisis parmi les enfants, les personnes âgées, les insuffisants hépatiques et/ou rénaux, les patients recevant un traitement induisant des toxicités organiques et/ou tissulaires hépatique ou rénale, les patients recevant un traitement à visée cardiaque, les patients recevant un traitement induisant des effets secondaires cardiovasculaires, les patients présentant des antécédents cardiovasculaires et/ou atteints de troubles cardiovasculaires.
18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que les antécédents cardiovasculaires et/ou troubles cardiovasculaires sont choisis parmi l'infarctus du myocarde, les troubles du rythme cardiaque (tachycardie, bradycardie, palpitations), les troubles de la pression artérielle (patients hypo- ou hypertendus) et les cardiopathies.
19. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce que le médicament contient :
- a) ledit mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et
 - b) au moins un composé actif choisi parmi les psychotropes, notamment les anti-dépresseurs, et les agent anti-muscariniques,
- comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps pour le traitement ou la prévention de la dépression, notamment la dépression profonde, la dépression résistante, la dépression du sujet âgé, la dépression psychotique, la dépression induite par des traitements interféron, l'état dépressif, le syndrome maniaco-dépressif, les épisodes dépressifs saisonniers, les épisodes dépressifs liés à une condition médicale générale, les épisodes dépressifs liés à des substances agissant sur l'humeur.
20. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce que le médicament contient :

- a) ledit mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et
- b) au moins un autre principe actif sélectionné parmi les composés actifs induisant une toxicité organique et les composés actifs induisant une toxicité cellulaire, notamment hépatique et/ou rénale,
- comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps pour le traitement ou la prévention des affections ou pathologies pouvant être soignées par l'inhibition double de la re-capture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA).
21. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce que le médicament contient :
- a) ledit mélange d'énantiomères enrichi en énantiomère (1S,2R) du Milnacipran et/ou d'au moins un de ses métabolites ainsi que leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et
- b) au moins un autre principe actif sélectionné parmi les composés actifs induisant des effets secondaires cardiovasculaires,
- comme produits de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps pour le traitement ou la prévention des affections ou pathologies pouvant être soignées par l'inhibition double de la re-capture de la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA).

1/4

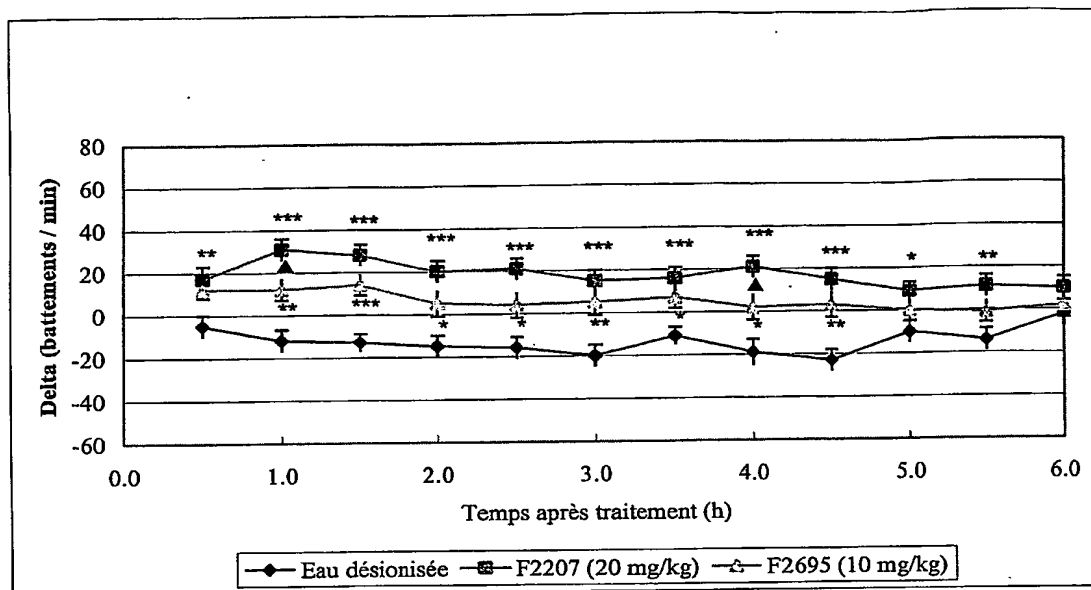


FIGURE 1

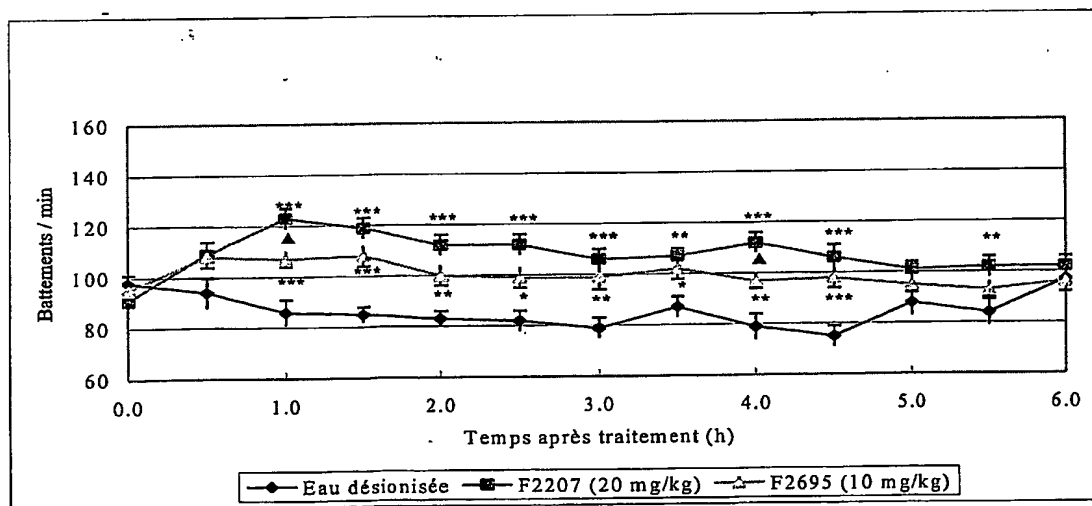


FIGURE 2

2/4

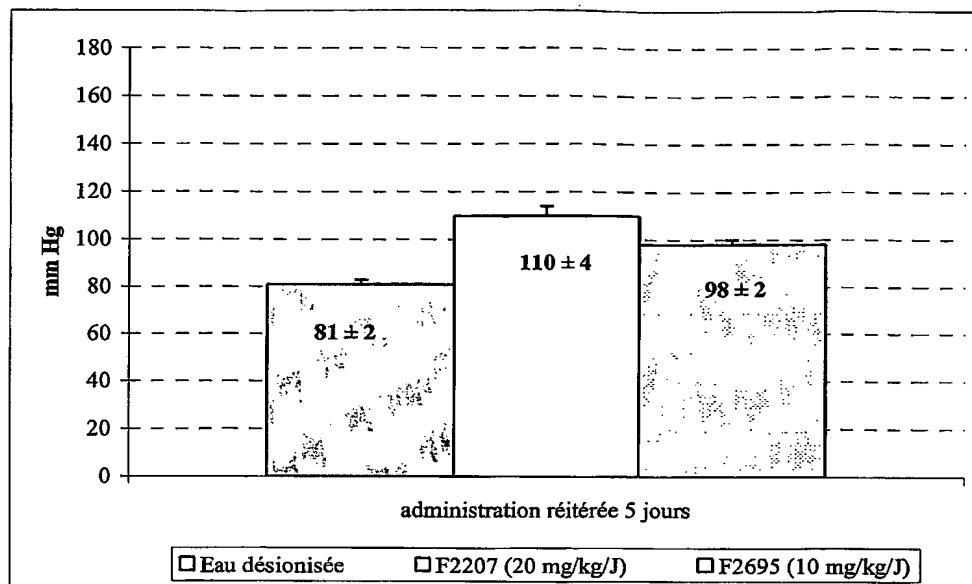


FIGURE 3

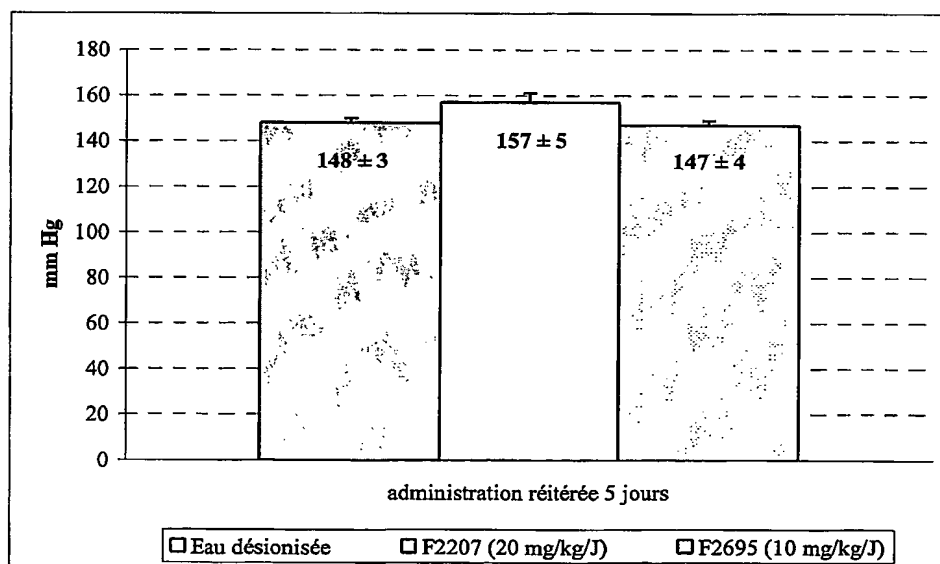


FIGURE 4

3/4

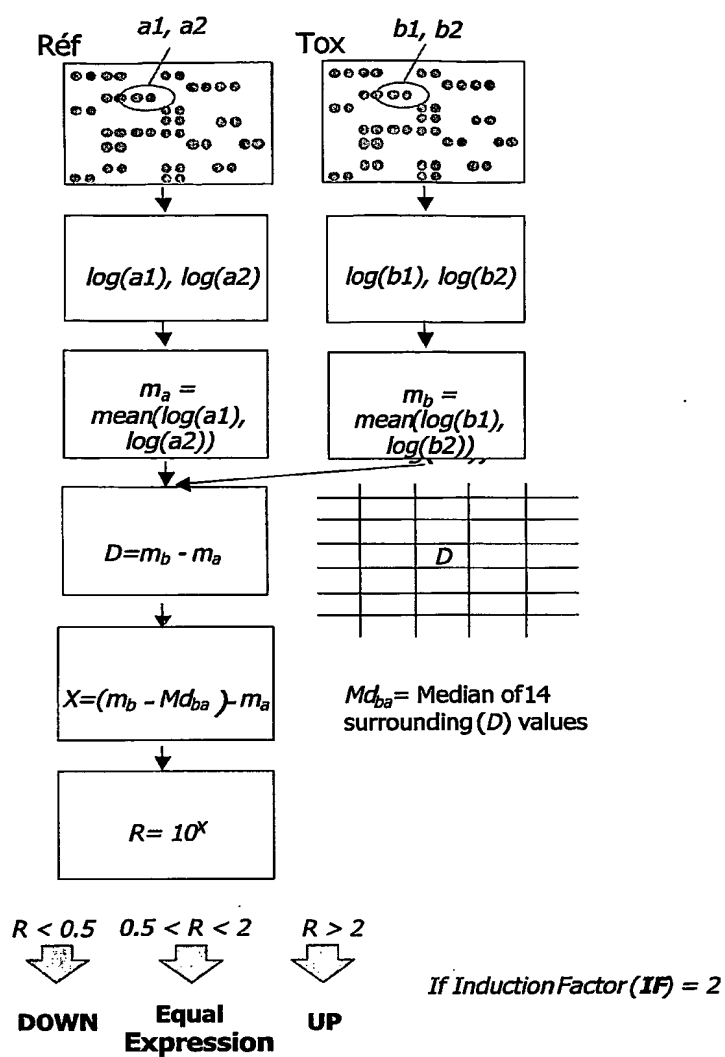
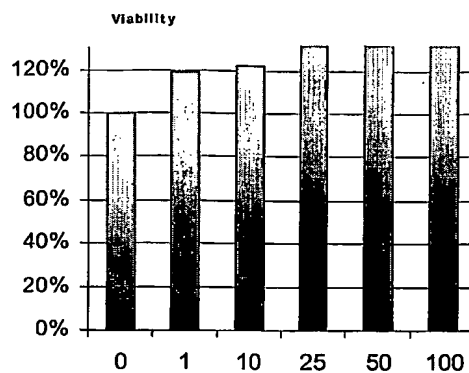


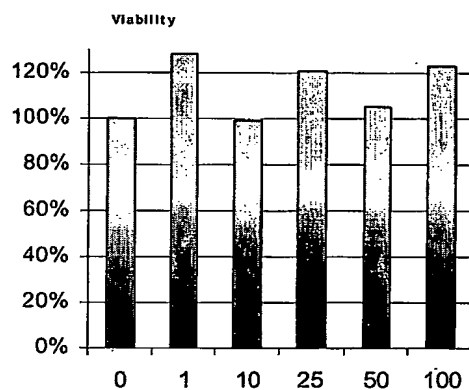
FIGURE 5

4/4



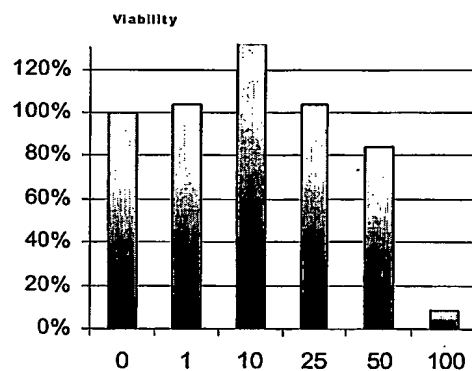
F2695

FIGURE 6A



F2696

FIGURE 6B



C218

FIGURE 6C